

⑯ 公開特許公報(A)

昭62-64802

⑮ Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	⑮ 公開 昭和62年(1987)3月23日
C 08 B 37/08		7133-4C	
A 61 K 1/00		7306-4C	
31/725	A B E	7252-4C	
	A D C	7252-4C	
47/00	3 3 6	B-6742-4C	
17/00		6779-4C	
A 61 L 27/00		C-6779-4C	
		審査請求 未請求 発明の数 9 (全46頁)	

⑯ 発明の名称 新規多糖類エステルおよびその塩

⑯ 特 願 昭61-161769

⑯ 出 願 昭61(1986)7月8日

優先権主張 ⑯1985年7月8日⑯イタリア(I T)⑯48322A85

⑯1986年6月30日⑯イタリア(I T)⑯48202A86

⑯ 発 明 者 フランセスコ・デラ・ イタリア国バドヴァ、グイア・チエラート14番  
ヴァツレ

⑯ 発 明 者 アウレリオ・ロメオ イタリア国ローマ、ピアレーイボクラータ93番

⑯ 出 願 人 フィデア・ソシエ イタリア国バドヴァ、35031アバーノ・テルメ、グイア・  
タ・ペル・アチオニ ポンテ・デツラ・ファブリーカ3-ア番

⑯ 代 理 人 弁理士 青山 葆 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

新規多糖類エステルおよびその塩

2. 特許請求の範囲

(1) ヒアルロン酸と脂肪族、芳香脂肪族、シクロ脂肪族または複素環系アルコールとの完全または部分的エステルおよび前記部分エステルと無機または有機塩基の塩類(ただしヒアルロン酸の完全メチルエステルは除く)。

(2) 脂肪族系アルコールが最高3-4個の炭素原子を有するものであり、非置換、またはアミノ、ヒドロキシ、メルカプト、アルデヒド、ケト、カルボキシ基、ヒドロカルビル、ジヒドロカルビルアミノ、エーテル、エステル、チオエーテル、チオエステル、アセタール、ケタール、カルボアルコキシ、カルバミドおよび1個または2個のアルキル基により置換されたカルバミドからなる群から選ばれた1個または2個の官能基により置換され得、上記官能基修飾基中の炭化水素残基は最高6個の炭素原子を有し、上記脂肪族系アルコールは、

炭素鎖を酸素、窒素および硫黄原子のようなヘテロ原子により中断され得るものである、特許請求の範囲第1項記載のヒアルロン酸エステルおよびその塩類。

(3) エステル化しているアルコール成分が、エチルアルコール、プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、n-ブチルアルコール、イソブチルアルコール、t-ブチルアルコール、アミルアルコール、ペンチルアルコール、ヘキシルアルコール、オクチルアルコール、エチレングリコール、プロピレングリコール、ブチレングリコール、またはグリセリンである、特許請求の範囲第2項記載のヒアルロン酸エステルおよびその塩類。

(4) 芳香脂肪族アルコールがベンゼン残基を1個だけ有し、脂肪族鎖が最高4個の炭素原子を含み、ベンゼン残基が1ないし3個のメチルもしくはヒドロキシル基またはハロゲン原子により置換され得、そして脂肪族鎖が置換アミノまたはモノもしくはジエチルアミノからなる群から選ばれた1個または2個の官能基またはピロリジンもしくはピ

ベリジン基により置換され得るものである、特許請求の範囲第1項記載のヒアルロン酸エステルおよびその塩類。

(5) アルコールがベンジルアルコール、フエチルアルコール、エフェドリンおよびアドレナリンからなる群から選ばれたものである、特許請求の範囲第4項記載のヒアルロン酸エステルおよびその塩類。

(6) アルコールが、シクロ脂族または脂族-シクロ脂族系のものであって炭素原子数最高34のモノまたはポリ環状炭化水素から由来するものである、特許請求の範囲第1項記載のヒアルロン酸エステルおよびその塩類。

(7) ポリ環状アルコールが、ステロール類、コール酸類、エチロイドアルコール類、エストラン系およびプレグナン系群、およびそれらの不飽和誘導体である、特許請求の範囲第6項記載のヒアルロン酸エステルおよびその塩類。

(8) アルコールが、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニソン、プレドニソロン、フルオロコ

ルチゾン、デksametaゾン、ベタメタゾン、コルチコステロン、デオキシコルチコステロン、パラメタゾン、フルメタゾン、フルオシノロン、フルオシノロンアセトニド、フルプレドニリジン、クロベタゾール、ベクロメタゾンからなる群から選ばれたものである、特許請求の範囲第7項記載のヒアルロン酸エステルおよびその塩類。

(9) 特許請求の範囲第1-8項の何れか1項記載のヒアルロン酸エステルとアルカリもしくはアルカリ土類金属、マグネシウムまたはアルミニウムとの塩。

(10) ナトリウムもしくはアンモニウム塩である、特許請求の範囲第9項記載の塩。

(11) 特許請求の範囲第1-8項記載の何れか1項記載の部分エステルと治療上許容されるアンモニウム、脂族、芳香脂族、シクロ脂族または複素環基との塩。

(12) 下群、すなわち

カルボキシル基の50%がエステル化され、50%がナトリウム塩とされているヒアルロン酸部

-3-

分プロピルエステル、

カルボキシル基の50%がエステル化され、50%がナトリウム塩とされているヒアルロン酸部分イソプロピルエステル、

カルボキシル基の85%がエステル化され、15%がナトリウム塩とされているヒアルロン酸部分ブチルエステル、

カルボキシル基の75%がエステル化され、25%がナトリウム塩とされているヒアルロン酸部分エチルエステル、

カルボキシル基の75%がエステル化され、25%がナトリウム塩とされているヒアルロン酸部分メチルエステル、

ヒアルロン酸完全メチルエステル、

ヒアルロン酸完全エチルエステル、

ヒアルロン酸完全プロピルエステル、

カルボキシル基の50%がエステル化され、50%がナトリウム塩とされているヒアルロン酸部分ブチルエステル、

カルボキシル基の75%がエステル化され、2

-4-

5%がナトリウム塩とされているヒアルロン酸部分エトキシカルボニルメチルエステル、

カルボキシル基の20%がエステル化され、80%がナトリウム塩とされているヒアルロン酸部分コルチゾンエステル、

カルボキシル基の20%がエステル化され、80%がナトリウム塩とされているヒアルロン酸部分ヒドロコルチゾンエステル、

カルボキシル基の20%がエステル化され、80%がナトリウム塩とされているヒアルロン酸部分フルオロコルチゾンエステル、

カルボキシル基の20%がエステル化され、80%がナトリウム塩とされているヒアルロン酸部分デオキシコルチゾンエステル、

カルボキシル基の80%がエタノールでエステル化され、20%がコルチゾンでエステル化されているヒアルロン酸エタノール-コルチゾン混合エステル、

カルボキシル基の80%がエタノールでエステル化され、20%がヒドロコルチゾンでエステル

-5-

-6-

-6-

化されているヒアルロン酸エタノール・ヒドロコルチゾン混合エステル、

カルボキシル基の80%がエタノールでエステル化され、20%がフルオロコルチゾンでエステル化されているヒアルロン酸エタノール・フルオロコルチゾン混合エステル、

カルボキシル基の80%がエタノールでエステル化され、20%がデオキシコルチゾンでエステル化されているヒアルロン酸エタノール・デオキシコルチゾン混合エステル、

カルボキシル基の40%がエタノールでエステル化され、20%がデオキシコルチゾンでエステル化され、残る40%がナトリウム塩とされているヒアルロン酸部分混合エタノール・デオキシコルチゾンエステル、

カルボキシル基の40%がエタノールでエステル化され、20%がコルチゾンでエステル化され、残る40%がナトリウム塩とされているヒアルロン酸部分混合エタノール・コルチゾンエステル、

カルボキシル基の40%がエタノールでエステ

ル化され、20%がヒドロコルチゾンでエステル化され、残る40%がナトリウム塩とされているヒアルロン酸部分混合エタノール・ヒドロコルチゾンエステル、

カルボキシル基の40%がエタノールでエステル化され、20%がフルオロコルチゾンでエステル化され、残る40%がナトリウム塩とされているヒアルロン酸部分混合エタノール・フルオロコルチゾンエステル、

ヒアルロン酸完全ベンチルエステル、

ヒアルロン酸完全イソベンチルエステル、

ヒアルロン酸完全ベンジルエステル、

ヒアルロン酸完全フェニルエステル、

エタノール(75%)で部分エステル化され、カルボキシル基の25%がストレプトマイシン塩とされている、ヒアルロン酸のストレプトマイシン塩、

エタノール(75%)で部分エステル化され、カルボキシル基の25%がエリスロマイシン塩とされている、ヒアルロン酸のエリスロマイシン塩、

-7-

エタノール(75%)で部分エステル化され、カルボキシル基の25%がネオマイシン塩とされている、ヒアルロン酸のネオマイシン塩、

エタノール(75%)で部分エステル化され、カルボキシル基の25%がゲンタマイシン塩とされている、ヒアルロン酸のゲンタマイシン塩、

エタノール(75%)で部分エステル化され、カルボキシル基の25%がアミカシン塩とされている、ヒアルロン酸のアミカシン塩、

エタノール(75%)で部分エステル化され、カルボキシル基の25%がカナマイシン塩とされている、ヒアルロン酸のカナマイシン塩、

エタノール(75%)で部分エステル化され、カルボキシル基の25%がピロカルビン塩とされている、ヒアルロン酸のピロカルビン塩、および

エタノール(85%)で部分エステル化され、カルボキシル基の15%がピロカルビン塩とされている、ヒアルロン酸のピロカルビン塩から選ばれたものである、特許請求の範囲第1項記載の化合物。

-8-

(13)有効成分として、特許請求の範囲第1項記載のエステルもしくはその塩の1種またはヒアルロン酸の完全メチルエステルを含み、医薬として許容される賦形剤または担体を併用してなる、医薬組成物。

(14)有効成分として、特許請求の範囲第1-12項記載のヒアルロン酸エステルを含み、医薬として許容される賦形剤または担体を併用してなる、特許請求の範囲第13項記載の医薬組成物。

(15) a)薬理活性物質1種またはそれ以上、および、

b)ヒアルロン酸と脂肪族、芳香族脂肪族、シクロ脂肪族または複素環系アルコールの完全もしくは部分エステルまたは前記部分エステルと無機もしくは有機塩基の塩、さらに所望によりヒアルロン酸またはその無機もしくは有機塩基との塩の1種からなる担体用薬質、および場合により

c)医薬製剤用一般賦形剤を含む薬剤。

(16)担体用薬質b)が、ヒアルロン酸と薬理学的に

不活性なアルコールとのエステルを含む、特許請求の範囲第15項記載の薬剤。

(17)担体用媒質(6)が、ヒアルロン酸と薬理学的に活性なアルコールとのエステルを含む、特許請求の範囲第15項記載の薬剤。

(18)媒質化合物が塩基性であり、非エステル化基が薬理活性物質で塩にされた部分ヒアルロン酸エステルを含む、特許請求の範囲第15項記載の薬剤。

(19)薬理活性物質が麻酔剤、鎮痛剤、抗炎症剤、血管収縮剤、抗生・抗菌剤、抗ウイルス剤からなる群から選ばれたものである、特許請求の範囲第15-18項の何れか1項記載の薬剤。

(20)活性物質 a) が局所活性を有するものである、特許請求の範囲第15-18項の何れか1項記載の薬剤。

(21)眼科用のものである、特許請求の範囲第15項記載の薬剤。

(22)皮膚科用、耳鼻咽喉科、歯科、脈管科、婦人科、神経科または任意の型の内科病理学用のものである、特許請求の範囲第15項記載の薬剤。

-11-

溶媒で処理することにより上記有機溶媒を除去することからなる、特許請求の範囲第24-27項の何れか1項記載のヒアルロン酸エステル製フィルムまたは糸の製法。

(28)ヒアルロン酸エステルを有機溶媒に溶かし、溶液をそれぞれシートまたは糸の形にし、ついで適当に加熱した不活性ガス気流で処理することにより上記有機溶媒を除去することからなる、特許請求の範囲第24-27項の何れか1項記載のヒアルロン酸エステル製フィルムまたは糸の製法。

(29)薬剤の皮下移植用カプセルの形、皮下、筋肉内または静脈内注入用マイクロカプセルの形、

一定期間後に除去する固体植込剤の形、

創傷および瘻々の治療への投薬用スポンジの形である、特許請求の範囲第24項記載の衛生・外科用品。

(30)酸性多糖類の第4級アンモニウム塩を非プロトン溶媒中でエステル化剤と処理し、所望ならば、得られた部分エステル中遊離カルボキシル基を塩

(23)特許請求の範囲第1-12項の何れか1項記載のヒアルロン酸エステルもしくはその塩類の1種またはヒアルロン酸完全メチルエステルを含む、化粧品。

(24)特許請求の範囲第1-12項の何れか1項記載のヒアルロン酸エステルもしくはその塩類の1種またはヒアルロン酸完全メチルエステルを含む、衛生・外科用品。

(25)フィルムまたは糸の形である、特許請求の範囲第24項記載の衛生・外科用品。

(26)外科皮膚科用人工皮膚またはこれに関係する外科手術用縫合糸の形である、特許請求の範囲第24項記載のフィルムまたは糸の形の衛生・外科用品。

(27)糸の投薬および外科用のものである、糸で作ったガーゼの形の特許請求の範囲第24-26項の何れか1項記載の衛生・外科用品。

(28)ヒアルロン酸エステルを有機溶媒に溶かし、溶液をそれぞれシートまたは糸の形にし、ついで最初の溶媒に可溶の他の適当な有機もしくは水性

-12-

にするかまたは塩になった基を遊離化することからなる、カルボキシル基含有酸性多糖類エステルの製法。

(31)動物性酸性多糖類を用いる、特許請求の範囲第31項記載の方法。

(32)植物性酸性多糖類を用いる、特許請求の範囲第31項記載の方法。

(34)スルホン酸基をも含む酸性多糖類を用いる、特許請求の範囲第31項記載の方法。

(35)ヒアルロン酸またはその分子フラクションの1つを用いる、特許請求の範囲第31項記載の方法。

(36)非プロトン性溶媒としてジメチルスルホキシドを用いる、特許請求の範囲第31項記載の方法。

(37)原料の塩として低級テトラアルキルアンモニウム塩を用いる、特許請求の範囲第31項記載の方法。

(38)酸性多糖類のテトラブチルアンモニウム塩を用いる、特許請求の範囲第31項記載の方法。

(39)炭素原子数1-6のアルキルから誘導された

カルボキシル基含有酸性多糖類テトラアルキルアンモニウム塩。

(40)酸性多糖類がヒアルロン酸またはその分子フракシオンの1つである、特許請求の範囲第39項記載の塩。

(41)ヒアルロン酸エステルが、おんどのりときかを抽出して得られ、分子重約800万〜約1300万の純ヒアルロン酸またはその塩の1つから由来している、特許請求の範囲第1〜12項の何れか1項記載のエステル。

(42)ヒアルロン酸エステルが、おんどのりときかをまずアセトンで脱水し、ついでババインによる酵素消化に付し、所望ならば、分子限外濾過に付し、さらに得られたヒアルロン酸フракシオンを精製して得られるヒアルロン酸に由来している、特許請求の範囲第1〜12項の何れか1項記載のエステル。

(43)ヒアルロン酸エステルが、分子重約1300万の純ヒアルロン酸の分子量の約90〜80%と0.23%の間の分子量のヒアルロン酸フракシ

-15-

この発明は新規薬劑、化粧品、医薬品および外科用品を包含する。

「ヒアルロン酸」(以後「H Y」とも称す)の塩はD-グルクロン酸およびN-アセチル-D-グルコサミンの残基により構成された様々な分子量の酸性多糖類を示すものとして文献に用いられており、細胞表面、脊椎動物の結合組織の基細胞外間充物質、関節の滑液、眼球ガラス体液、ひとのせい帯組織および雄ワトリのときかに天然に存在するものである。

ヒアルロン酸は第一に皮膚、腱、筋肉および軟骨のような多くの組織の細胞機構の支持物質として生物体における重要な役割を演じ、したがって細胞内マトリックスの主成分である。しかしまたヒアルロン酸は例えば組織の水和、潤滑化、細胞移動、細胞機能および分化のような生物プロセスにおける他の機能も果たす[例えばバラツ等、「コスメティックス・アンド・トイレットリーズ」(Cosmetics & Toiletries), 第5/84号、8-17頁参照]。ヒアルロン酸は前述の天然組

成に由来している、特許請求の範囲第1〜12項の何れか1項記載のエステル。

(44)ヒアルロン酸エステルが、先行文献でヒアルステンとして同定され、分子重約50000〜100000を有し、分子量30000未満のヒアルロン酸を實質的に含まない分子フракシオンに由来している、特許請求の範囲第1〜12項の何れか1項記載のエステル。

(45)ヒアルロン酸エステルが、先行文献でヒアレクチンとして同定され、分子重約50000〜730000を有し、分子量30000未満のヒアルロン酸を實質的に含まない分子フракシオンに由来している、特許請求の範囲第1〜12項の何れか1項記載のエステル。

### 3. 発明の詳細な説明

#### [発明の背景および分野]

この発明は、新規多糖類エステルおよびさらに正確にはヒアルロン酸エステル並びに医薬および化粧品分野および生物分解性プラスチック物質の分野における用途に関するものである。したがって

-16-

織、例えば雄ワトリのときか、またはある種のバクテリアからも抽出され得る。現在では、ヒアルロン酸はまた微生物学的方法により製造され得る。抽出により得られたヒアルロン酸全体の分子量は800万〜1300万の範囲である。しかしながら、多糖類の分子量は例えば機械的作用または放射、加水分解、酸化もしくは酵素剤の作用のような様々な物理的および化学的要素の影響を受けて全く容易に減成され得る。このため通常の抽出物の普通精製方法においてしばしば低分子量の減成されたフракシオンが得られる。(バラツ等、前出参照)。ヒアルロン酸、その分子フракシオンおよびそれぞれの塩類は、薬剤として使用されてきたが、またこれらの化粧品用途も提案されている。(例えばバラツ等による前述の論文およびフランス国特許第2478468号参照)。

治療薬剤としてヒアルロン酸およびその塩類は例えばウマの関節炎治療に用いる獣医薬薬のように関節症治療に特に用いられてきた[アクタ・ベテリナリカ・スカンジナビカ(Acta. Vet. Scand.

-17-

-9-

-18-

〕167巻、379頁(1976年)〕。天然組織および器官用の補助および代用治療剤としてヒアルロン酸およびその分子フラクションおよびそれらの塩は眼科手術に使用されてきた〔例えばパラッツ等、「モダン・プロブレムズ・イン・オプタルモロジー」(Modern Problems in Ophthalmology)第10巻、1970年、3頁-シュトリフ、カーゲル著、バーゼ、[ビスコサージェリー・アンド・ザ・ユーズ・オブ・ソディウム・ヒアルロネート・デュアリング・イントラオキュラー・レズ・インプラメンテーション](Viscosurgery and the Use of Sodium Hyaluronate During Intraocular Lens Implantation)、眼内科植に関する国際会議および第1回フィルム・フェスティバルで提出された論文、カンヌ、1979年、米国特許第4328803号(眼科におけるHYの使用に関する文献の要約付)および米国特許第4141973号参照〕。

1983年10月11日付イタリア国特許出願第49143A83号では、ヒアルロン酸の分子

フラクションが例えば眼の内部流体の代用物および関節症治療にそれぞれ適した眼内および関節内注射用にナトリウム塩として使用することができること記載されている。

ヒアルロン酸はまたポリウレタン、ポリエステル、ポリオレフィン、ポリリミド、ポリシロキサン、ビニルおよびアクリルポリマー並びにカーボンファイバーのような医薬品および手術用品に用いられる広範な種類のポリマー物質に対する添加剤としても使用され得、これらの物質を生物学的適合性のあるものとする作用を有する。この場合HYまたはその塩の1種の添加は、たとえばこのような物質の表面を覆うか、前記表面に分散させるかまたはこれらの両方の処理をすることにより行なわれる。このような物質は例えば心臓バルブ、眼内レンズ、導管クリップ、ペースメーカー等のような様々な衛生用品および医療品の製造に用いられ得る(米国特許第4500676号参照)。

「ヒアルロン酸」の語は前述したことからわかるように様々な分子量のD-グルクロン酸およびN

-18-

-アセチル-D-グルコサミン残基を交互にもつ一連の多糖類またはその減成フラクション全体を包含するため(単数形では)一般に不適当な表現で用いられていることになり、また複数形「ヒアルロン酸」の方がより適当であり得るが、この明細書で記載する場合に一貫して単数形を用いることにより分子フラクションを含む様々な形のヒアルロン酸を指すことにし、また省略形「HY」もこの集合語の記載にしばしば用いることにする。

ヒアルロン酸エステル類に関しては、ひとのせい帯から抽出することにより得られる高分子量のヒアルロン酸メチルエステルが文献に記載されている〔ジャンロツ等、「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー」(J. Biol. Chem)、186巻(1950年)495-511頁およびイエガー等、「ジャーナル・オブ・バクテリオロジー」(J. Bacteriology)106巻-1067頁(1979年)〕。このエステルはエーテル溶液中遊離ヒアルロン酸をジアゾメタンで処理することにより得られ、その結合実質的に全郡のカルボ

-19-

キシル基がエステル化されることがわかった。さらに、約5ないし15個の二糖単位を有するHYオリゴマーメチルエステル類もまた記載された〔バイオケミカル・ジャーナル(Biochem. J.) (1977年)167巻711-716頁参照〕。またアルコール性水酸基の部分でメチルアルコールによりエーテル化されたヒアルロン酸メチルエステルも記載されている〔ジャンロツ等、「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー」(J. Biol. Chem)194巻(1952年)141-150頁、およびジャンロツ等(ヘルベティカ・シムカ・アクタ(Helvetica Chimica Acta)85巻、(1952年)262-271頁)〕。これらのエステル類についての生物活性および当然医療用途は一切報告されていない。

【この発明の詳細な記載】

この発明の対象によると、生物学的適合性または薬理学的見地から許容性のある、ヒアルロン酸と脂肪族、芳香脂肪族、脂環式またはエーテル型アルコールのエステル類(ただし、酸のカルボ

キシル基の全部または一部分だけがエステル化されている)および部分エステルと金属または有機塩基とからなる塩は、興味深く、貴重なバイオプラスチックおよび医薬特性を有し、また化粧、外科および内科を含む多数の分野で使用され得る。新製生成物が性質上同じかまたは類似の物理-化学、薬理および治療特性を有する場合でも、ヒアルロン酸の方が特にヒアルロニダーゼのように有機体中の多糖分子の合成にたずさわる天然酵素の作用について特に顕著な安定性を示すため、これらはかなりの長期間でも上記特性を維持することができる。

この発明によるエステルの第1群は治療および他の前述の分野において有用性があるため、ヒアルロン酸自体の性質が主となり、活かされ得るものにより代表される。このようなエステルは例えば飽和脂肪族系アルコール系または脂溶性単純アルコール系のようにそれ自体が顕著な薬理作用をともなわない前述のアルコール系から得られる。

他方、治療上有用なエステルの第2群は、アル

-23-

的に不活性なアルコールのエステル基に起因した、薬理活性アルコールと同じ薬理活性を有しながらヒアルロン酸の特異作用をともなわないが前述の良好な安定性および生物学的利用能を有するエステルを得ることが可能である。

第4群のエステル類は、エステル基が2種の異なる治療活性物質に由来する混成特質のエステル類により代表される。この場合もまた、エステルは部分的または全体的であり得、すなわち、一部のカルボキシル基だけが例えばコルチゾンステロイドおよび抗生物質またはフェノチアジンのように2種の異なる治療活性アルコールによりエステル化されているが、他のカルボキシル基は遊離しているかまたは例えばアルカリ金属、特にナトリウム塩にされ得るか、または全部のカルボキシル基が前述のアルコールによりエステル化されている。しかしながら、また3種またはそれ以上のアルコール成分とのエステル、例えば1部分のカルボキシル基が治療活性アルコールによりエステル化され、別の部分が別の治療活性アルコールによ

りアルコールの薬理特性が主たるものとなるエステル類により代表される。すなわち、H Yと薬理学的活性のあるアルコール類例えばステロイドアルコールとのエステル類、例えば抗炎症作用のあるコルチゾン型のものがある。これらの化合物はアルコールの場合と類似の特性を有するが、低知エステル類と比べて特異な範囲の作用を有し、薬理活性は確実にバランス良好、不揃い一定しており、また普通著しい運送効果を得られる。

この発明によるH Yエステルの第3群は特に独特で有用な面を呈し、前記2群よりも達成した性質を有するエステルである考えられる。すなわち、H Yのカルボキシル基の一部分が薬理活性のあるアルコールによりエステル化され、また別の部分が薬理学的に不活性なアルコールによりエステル化されているエステル類、または上記溶剤がごくわずかなものであるエステル類である。エステル化成分として2種のタイプのアルコール類を適当な割合で混合することにより、薬理活性アルコールの望ましい特有の活性に関連があり、かつ薬理学

-24-

りエステル化され、第3部分が治療上不活性なアルコールによりエステル化され、第4部分が可能ならば金属および治療活性もしくは不活性塩基との塩にされているかまたは、遊離形のカルボキシル基を含むエステルを製造するものもできる。

カルボン酸基が遊離したままのものもある前述のエステルにおいて、これらは金属または有機塩基、例えばアルカリもしくはアルカリ土類金属または含アンモニアもしくは薬素有機塩基との塩にされ得る。

H Y自体とは異なり、ほとんどのH Yエステルは有機溶媒中においてある程度の溶解性を示す。この溶解性はエステル化されたカルボキシル基の比率およびカルボキシルと結合したアルキル基のタイプにより異なる。したがって全部のカルボキシル基がエステル化されたH Y化合物は室温で、例えばジメチルスルホキシドにおいてすぐれた溶解性を示す(H Yベンジルエステルは200 mg / mlの割合でDMSOに溶ける)。全部がエステル化されたH Yエステルのほとんどはまた、H Y

および特にその塩とは異なり、水にはあまり溶けない。

H Y エステルは前記の溶解特性と同時に特別の苦しい粘弾特性を有するため、食塩水に不溶性で特定の望ましい形態を呈する衛生および医療調製品を得るのに用いることができる。これらの物質は、H Y エステルと有機溶媒からなる溶液を調製し、強粘性溶液を所望の物品の形に成形し、最初のものとは異なるがH Y エステルには不溶性である別の溶媒により有機溶媒を抽出する。

この発明によるヒアルロン酸エステルは、前述のひとのせいで抽出されるヒアルロン酸メチルエステルおよび前述のH Y オリゴマーメチルエステル以外はすべて新規のものである。したがってまた、メチルアルコールとのヒアルロン酸部分エステルおよび金属または有機塩基との塩も新規である。文献に記載された前述のメチルエステルの生物学的および薬理学的活性は、その優れたバイオプラスチック特性および高安定性と同様知られていなかった。したがってまた、薬剤、化粧品、

- 27 -

ステルを含有するこれらの薬剤のうち、局所用に用いられるものが特に重要である。したがって、この発明の主たる対象はヒアルロン酸と脂肪族、芳香脂肪族、脂環式または複素環系アルコールとの完全または部分的エステルおよび前記部分エステルと無機または有機塩基の塩に代表されるが、ただし実質的に全部のカルボキシル基がエステル化されたヒアルロン酸メチルエステルは除くものとする。

この発明の第2の対象は、活性成分としてヒアルロン酸の完全なメチルエステルを含む1種またはそれ以上のヒアルロン酸エステル類または前記の塩の1種を含有する医薬製剤およびこのようなエステル類の治療用途により代表される。

この発明の第3の対象は、

1) 薬理活性物質または薬理活性物質の組み合わせ、および、

2) ヒアルロン酸と脂肪族、芳香脂肪族、脂環式または複素環系アルコールの完全もしくは部分エステルまたは前記部分エステルと無機もしくは

衛生用品および外科用品並びにこの発明の一部である前述の新規生成物の製造を目的とするこれらのエステルの用途も知られていなかった。したがって、特に既知のH Y メチルエステルを含有する医薬製剤もまた新規である。

最後に、この発明はまた活性医薬物質の塩体としての前述の新規生成物および前述の公知メチルエステルの用途、並びに前述のヒアルロン酸エステル誘導体および1種またはそれ以上のこれら活性物質を含有する薬剤を包含する。このような医薬の場合ヒアルロン酸エステルまたはその塩の1種は好ましくは薬理学的に不活性なアルコールに由来するものであるが、また薬理学的に活性のアルコールに由来するエステルでもあり得、それ自体薬理活性を有することもあり得る。ヒアルロン酸エステルまたはその塩の1種に代表される成分の塩体作用は、処置される部位の生物学的環境と特に融粘性のある状態下調整すべき活性物質の同化において認められる。これは特に眼科分野に於ては重要である。塩体としてヒアルロン酸エ

- 28 -

有機塩基の塩、さらに所望によりヒアルロン酸またはその無機もしくは有機塩基との塩の1種からなる塩体

を含む薬剤並びにこれらの薬剤の治療用途で表わされる。

この発明の第4の対象は、化粧品における前記エステルおよび塩の用途並びにこれらのエステルを含有する化粧品に代表される。

この発明の第5の対象は、衛生用品および外科プラスチック用品の製造における前記エステルおよび塩の用途並びにこのような用品そのものに代表される。

この発明による新規および公知エステル類の別の用途は、衛生用品、化粧品および外科用品の製造を目的とするもので、その場合ヒアルロン酸エステルは様々な前記ポリマーのようにこの目的にかなう基本物質の塩体として作用する。

最後にこの発明の別の対象は、ヒアルロン酸エステルおよび部分エステルの塩の製造方法を主とする。



この発明によるヒアルロン酸のカルボキシル基のエステル化成分として用いられる脂肪族アルコールは例えば最高34個の炭素原子を有するものであり、飽和または不飽和であり得、また可能ならば他の遊離官能基もしくは官能修飾基、例えばアミン、ヒドロキシル、アルデヒド、ケトン、メルカプタンまたはカルボキシル基、またはこれらに由来する基、例えば炭化水素(hydrocarbyl)もしくは炭化水素アミン基(以後「炭化水素残基(hydrocarbyl)」の語は、 $C_nH_{2n+1}$ 型のような一価の炭化水素基だけでなく、「アルキレン」 $C_nH_{2n}$ または「アルキリデン」 $C_nH_{2n}$ のような二価もしくは三価の基を指す場合にも用いることにする)、エーテルもしくはエステル基、アセタールもしくはケタール基、チオエーテルもしくはチオエステル基、およびエステル化カルボキシルもしくはカルバミド基および1個またはそれ以上の炭化水素残基、ニトリル基またはハロゲンにより置換されたカルバミドにより置換され得る。

炭化水素残基を含む前述の基の中で、最高6個

-31-

チルアルコール、1-ブチルアルコール、アミル、ペンチル、ヘキシル、オクチル、ノニルおよびドデシルアルコール並びにとりわけn-オクチルおよびドデシルアルコールのような直鎖を有するものである。この群の置換アルコールの中で二価アルコール、例えばエチレングリコール、プロピレングリコールおよびブチレングリコール、並びにグリセリンのような三価アルコール、アルデヒドアルコール、例えばタルトロン(tartronic)アルコール、例えば乳酸、グリコール酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸のようなカルボン酸アルコール、アミノアルコール、例えば直鎖状アミノエタノール、アミノプロパノール、直鎖状アミノブタノールおよびアミノ官能基がジメチル化およびジメチル化された誘導体、コリン、ピロリジニルエタノール、ピペリジニルエタノール、ピペラジニルエタノールおよびn-プロピルもしくはn-ブチルアルコールの対応する誘導体、モノチオエチレングリコールまたはそのアルキル誘導体、例えばメルカプタン官能基のエチル誘導体が挙げられる。

-32-

の炭素原子を有する例えばアルキルのような低級脂肪族基が好ましい。また前記アルコールは、炭素鎖を酸素、窒素および硫黄原子のようなヘテロ原子により中断され得る。1個または2個の前記官能基により置換されたアルコールが好ましい。

この発明の範囲内で好ましくは使用される前述の群のアルコールは、最高12個および特に6個の炭素原子を有するものであり、前記アミン、エーテル、エステル、チオエーテル、チオエステル、アセタール、ケタール基における炭化水素残基は最高4個の炭素原子を有するアルキル基を示し、またエステル化されたカルボキシルまたは置換されたカルバミド基における炭化水素残基は同数の炭素原子を有するアルキル基であり、そしてアミンまたはカルバミド基の場合最高8個の炭素原子を有するアルキレンアミンまたはアルキレンカルバミド基であり得る。これらのアルコールの中で特に判要すべきものは、飽和および非置換のもの、例えばメチル、エチル、プロピルおよびイソプロピルアルコール、n-ブチルアルコール、イソブ

-33-

高級飽和脂肪族アルコールの中ではセチルアルコールおよびミリスチルアルコールが挙げられるが、この発明の目的としては、1個または2個の二重結合を有する高級不飽和アルコールが特に重要であり、例えば特に多くの精油中に含まれ、テルペンとの親和力を有するもの、例えばシトロネロール、グラニオール、ネロール、ネロリドール、リナロール、ファルネソール、フィトールが挙げられる。不飽和低級アルコールの中ではアリルアルコールおよびプロパルギルアルコールが重要である。芳香脂肪族アルコールの中ではベンゼン残基を1個だけ有し、脂肪族鎖が最高4個の炭素原子を含み、ベンゼン残基が1ないし3個のメチルもしくはヒドロキシルまたはハロゲン原子、特に塩素、酸素および硫黄により置換され得、そして脂肪族鎖が遊離アミン基またはメノもしくはジメチルアミンからなる群から選ばれた1個またはそれ以上の官能基またはピロリジンもしくはピペリジン基により置換され得るものが特に重要である。これらのアルコールの中でベンジルアルコー

-13-

-34-

ルおよびフェネチルアルコールに特に留意すべきである。

脂環式または脂肪族-脂環式アルコールはモノまたは多環式炭化水素に由来し、好ましくは最高3-4個の炭素原子を有し、不飽和であり得、前記脂肪族アルコールのところで前述したもののような1個またはそれ以上の置換基を有し得る。単環式炭化水素に由来するアルコールの中では最高12個の炭素原子を有し、好ましくは5ないし7個の炭素原子が環を形成し、例えば1ないし3個の低級アルキル基例えばメチル、エチル、プロピルまたはイソプロピル基により置換され得るものに特に留意すべきである。この群に属するアルコールの中で特に次のものが挙げられる。すなわち、シクロヘキサノール、シクロヘキサジオール、1,2,3-シクロヘキサントリオールおよび1,3,5-シクロヘキサントリオール(フロログリシトール、phloroglucitol)、イノシトール、並びにp-メタン由来のアルコール、例えばカルボメントール、メントールおよび $\alpha$ -7-テルピネオール、

-35-

ル、エキレニン、エキリンおよびそれらのアルキル化誘導体、並びに17位がエチニルもしくはプロピニルである誘導体、例えば17 $\alpha$ -エチニルエストラジオールまたは17 $\alpha$ -メチル-17 $\alpha$ -エチニルエストラジオール、プレグネノロン、プレグナジオール、テストステロンおよびその誘導体、例えば17 $\alpha$ -メチルテストステロン、1,2-デヒドロテストステロンおよび17 $\alpha$ -メチル-1,2-デヒドロテストステロン、17 $\alpha$ がアルキニル化されたテストステロンおよび1,2-デヒドロテストステロン誘導体、例えば17 $\alpha$ -エチニルテストステロン、17 $\alpha$ -プロピニルテストステロン、ノルゲステロン、ヒドロキシプロゲステロン、コルチコステロン、デオキシコルチコステロン、19-ノルテストステロン、19-ノル-17 $\alpha$ -メチルテストステロンおよび19-ノル-17 $\alpha$ -エチニルテストステロン、アンチホルモン類例えばシプロテロン、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾン、フルオロコルチゾン、デキサメタゾン、

-37-

ル、1-テルピネオール、4-テルピネオールおよびビトリール、または「テルピネオール」として知られているこれらのアルコールの混合物、1,4-および1,8-テルピニン、ツジャン(thujan)、ピナン(pinane)またはコンファン(conephane)の場合のように縮合環を有する炭化水素由来のアルコールの中では、ツジノール、サビノール、ピノール水和物、DおよびL-ボルネオール並びにDおよびL-イソボルネオールを挙げることができる。

この発明のエステルに用いられる脂肪族-脂環式多環状アルコールには、ステロール、コル酸(胆汁酸)およびステロイド、例えば性ホルモンおよびその合成類似体、特にコルチコステロイドおよびその誘導体がある。したがって、コレステロール、ジヒドロコレステロール、エビジヒドロコレステロール、コプロスタノール、エビコプロスタノール、シトステロール、スチグマステロール、エルゴステロール、コル酸、デオキシコル酸、リトコル酸、エストリオール、エストラジオール

-38-

ベタメタゾン、パラメタゾン、ワルメタゾン、フルオシノロン、フルアレドニリジン、クロベタゾン、ベクロメタゾン、アルドステロン、デオキシコルチコステロン、アルファエキソロン、アルファアドロン、ボラスチロンを用いることができる。この発明のエステルのエステル化成分としては、例えばキトキシゲニン、ギトキシゲニン、ジギキシゲニン、ストロファンチジン、チゴニンおよびサボニンのような心臓作用性グルコシドのゲニン(アグリコン)を用いることができる。

この発明にしたいが使用される他のアルコールには、ビタミン類、例えばアセロフトール、ビタミンD<sub>3</sub>およびD<sub>2</sub>、アノイリン、ラクトフラビン、アスコルビン酸、リボフラビン、チアミン、パントテン酸がある。

複素環状酸の中で、前述の脂環式または脂肪族-脂環式アルコールの誘導体として考えられるのは、直鎖または環状酸が1個またはそれ以上、例えば1ないし3個の、例えば-O-、-S-、-N-、-NH-からなる群から選ばれたヘテロ原

子により中断されている場合であり、そして1個またはそれ以上の不飽和結合、例えば二重結合が特に1ないし3個存在し得、芳香族構造を有する複素化合物もまた含まれる。例えば次のものがあげられる。即ち、フルフリルアルコール、アルカロイドおよび誘導体、例えばアトロピン、スコポラミン、シンコニン、シンコニジン、キニン、モルフィン、コデイン、ナロルフィン、N-ブチルスコポランモニウムアロミド、アジマニン、フェニルエチルアミン塩、例えばエフェドリン、イソプロテノール、エビネフリン、フェノチアジン剤、例えばベルフェナジン、ピロチアジン、カルフェナジン、ホモフェナジン、アセトフェナジン、フルオフェナジン、N-ヒドロキシエチルプロメタジノクロリド、チオキサンテンチン、例えばフルベンチキソールおよびクロベンチキソール、抗けいれん薬、例えばメプロフェンジオール、抗精神薬、例えばオピプラモール、制吐剤、例えばオキシベンジル、鎮痛剤、例えばカルベチジンおよびフェノペリジンおよびメタドール、催眠薬、例え

ばエトドロキシジン、食欲減進剤、例えばベンジドロールおよびジフェメトキシジン、マイナートランキライザー、例えばヒドロキシジン、筋弛緩薬、例えばシナメドリン、ジフィリン、メフェネシン、メトカルバモール、クロムフェネシン、2,2-ジエチル-,1,3-プロパンジオール、グアイフェネシン、ヒドロシラミド、冠動脈拡張剤、例えばジリリジモールおよびオキシフェドリン、アドレナリン作用遮断薬、例えばプロパノール、チモロール、ビンドロール、ブプラノロール、抗腫瘍薬例えば6-アザウリジン、シタラビン、フロクスウリジン、抗生物質、例えばテトラムフェンコール、チアムフェニコール、エリスロマイシン、オレオンドマイシン、リンコマイシン、抗ウイルス薬、例えばイドクスウリジン、末梢血管拡張剤、例えばイソニコニルアルコール、炭酸脱水酵素阻害剤、例えばスロカルベレート、抗喘息薬および抗炎症剤、例えばチアラミド、スルファミン酸誘導体、例えば2-アスルファニロノエタノール。

-39-

すでに述べたように、場合によりエステル基が2個またはそれ以上の治療活性ヒドロキシル物質由来のものであるヒアルロン酸エステルが興味の対象となり得、また当然可能な限りの変異型も得られる。特に興味深いのは水酸基特性のある薬剤由来の2種の相異なるエステル基が存在し、そして残りの水酸基が遊離、金属または後で列記する1種または様々な型類の塩基もしくはまた可能なならば例えばエステル化成分と同じかまたは類似の活性を有する、それ自体が治療活性を示す塩基により塩にされた物質である。特に、抗炎症ステロイド由来のヒアルロン酸エステル、例えば既述したものの1種、およびビタミン、アルカロイドまたは抗生物質由来のヒアルロン酸エステル、例えば列記されたものの1種を得ることができる。

前述のアルコールによるヒアルロン酸のエステル化程度は第一に様々な適応分野で得られる特性、例えば皮膚のようなある種の組織の場合に、脂溶性または親水性が強い弱いかにより異なる。

通常、ヒアルロン酸のエステル化度が高い割合

-40-

から完全なものになるにしたがい脂溶性と性が高まるため水に対する溶解性は低くなる。この発明の新規エステルを治療に用いる場合、例えば、エステル化度を一定にすることにより、ヒアルロン酸またはそのナトリウム塩と比べて良好で高い脂溶性と性を有する半面充分な水溶性例えば10mg/mlの溶解度を確保することが特に重要である。当然、普通反比例的に水溶性に影響を与える同エステル化成分の分子サイズの影響も念頭に置かなければならない。既に述べたように、ヒアルロン酸のカルボキシ基をエステル化すると異なる分野、例えば治療薬としてエステルを用いる内科またはエステルをプラスチック製品として用いる外科において有用性のある、様々な役割を果たすことになり得る。治療に用いる場合、すでに述べたようにそれ自体治療活性のあるアルコール、例えば抗炎症コルチコステロイドをヒアルロン酸によりエステル化するということは治療有効性を改善する手段であるとみなすこともできる。

したがって同様な治療活性アルコールに関して、

ヒアルロン酸は生物学的環境と完全に融和し得る特に有効な担体として作用する。この発明によるエステル化に用いられるアルコールの前記リストには、数種のこのような薬理活性アルコールが存在し、したがって対応するエステルの可能な適用は、適応症が遊離アルコールの場合と同じであるため明らかである。また、すでに述べたように、治療活性アルコールとの部分エステルの場合、ヒアルロン酸成分の残りのカルボキシル基の一部または全部を薬理的に不活性なアルコール、例えばエチルもしくはイソプロピルアルコールのような飽和脂肪酸アルコールによりエステル化することもできる。

この発明の特に興味深い点は、現在利用できるものよりも安定性の高い薬剤の製造可能性である。したがってエステルが溶剤として作用する関節内注射のようなヒアルロン酸自体の代表的適応例に使用するためのヒアルロン酸と治療上不活性なアルコールとのエステルを製造することも可能である。遊離酸と比べるとヒアルロニターゼに対す

るエステルの安定性が改善されたものであるため、これまでよりかなり長い作用時間を達成することができる。他方、H-Yと治療活性アルコールによる前述のエステルおよび可能なば治療活性塩基により塩にされたものについて「遅延」作用を有する薬剤を得ることも可能である。エステラーゼによる活性アルコールの遊離および加水分解作用により塩にされた基の遊離は非常にゆっくりとしたものである。

化粧用途の場合、薬理的に不活性なアルコール、例えば飽和または不飽和脂肪アルコール、例えば具体的に前述したもののよう、例えば1個ないし8個の炭素原子からなる直鎖または分岐状のような上記タイプの非置換アルコールとヒアルロン酸の完全または部分エステルを用いるのが好ましい。とくに興味深いものは1個またはそれ以上の二重結合を有する不飽和アルコール、例えばビニルまたはアリールアルコールおよびそれらの錯体誘導体、例えば特にポリビニルアルコールまたは多価アルコール、例えばグリセリンである。こ

-42-

の場合もまた本来の目的にしたい混合エステルを用いることもできる。

また脂環式アルコール類、例えばシクロペンタンまたはシクロヘキサンの誘導体および低級アルキル基、例えば1ないし4個の炭素原子を有するアルキル基、特にメチル基により置換された誘導体が有用である。前述したようなテルペン由来および治療活性アルキル由来の脂環式および脂肪酸-脂環式アルコールとのエステル類もまた特に興味深いものであり、また化粧品にも用いられる。

衛生および外科用品製造に好ましくは使用されるアルコールは化粧品用として既に挙げたものと実質的に同じである。この発明による部分エステルの場合、エステル化された基の比率は生成物の目的とする用途およびとりわけ様々な分野の前記適応例における用途にしたい大きく変化する。

しかしながら特に興味深いのは、H-Yの全カルボキシル基の少なくとも5%ないし多くとも90

-44-

%がエステル化された部分エステルおよび特に50ないし80%の比率でエステル化されたものである。

異なる種類のエステル基の数の割合もまた混合部分エステルの場合明らかに変化する。例えば2種類の基の場合、この割合は好ましくは0:1:1ないし1:0:1の間で変化するが、このことは完全なエステルにも当てはまる。治療用途を目的とするエステルの場合この割合は好ましくは0:5:1ないし1:0:5である。この割合は好ましくは完全なエステルにも有効であり、また部分エステルの場合このような割合は好ましくはエステル化された基の包括的な数について前述した比率に応じた数値をとる。

この発明の部分エステルにおいて非エステル化カルボキシル基は遊離したままであり得るかまたは塩にされ得る。このような塩を生成する場合塩基は生成物が目的とする用途に適した基にしたがい選ばれる。カリウムおよび特にナトリウムのようなアルカリ金属およびアンモニウムとの鹽類

-45-

-16-

-46-

塩、またはカルシウムもしくはマグネシウムのようなアルカリ土類金属またはアルミニウム塩のような無機塩を生成することができる。

有機塩基、特に窒素と化合した塩基すなわち脂肪族、芳香族脂肪族、脂環式または複素アミン類との塩が特に興味深い。

前記アンモニウム塩は治療上許容されるが不活性なアミン類または治療活性のあるアミン類に由来し得る。前者の中では脂肪族アミン類、例えば最高18個の炭素原子からなるアルキル基を有するモノ、ジおよびトリアルキルアミン類または脂肪族部分に同数の炭素原子を有するアリールアルキルアミンが必要であるが、ここでアリールは1個ないし3個のメチル基またはハロゲン原子またはヒドロキシル基により置換され得るベンゼン基のことである。塩の生成に用いる生物学的に不活性な塩基もまた脂肪族、例えば4ないし6個の炭素原子からなる環を有する単環式アルキレンアミンであり得、窒素、酸素および硫黄からなる群から選ばれたヘテロ原子により環が中断されていること

もあり、(例、ピペリジンまたはモルホリン)、またアミノエタノール、エチレンジアミン、エフェドリンまたはコリンのように例えばアミンまたはヒドロキシル官能基により置換され得る。

部分エステルは第四級アンモニウム塩、例えば前述の数の炭素原子を有するテトラアルキルアンモニウム塩および好ましくは4番目のアルキル基が1個ないし4個の炭素原子を有する(例、メチル基)タイプの塩を生成することもできる。

治療活性が用途にかなう生物学的活性アミンには下記の群に含まれるもののような窒素を結合した塩基性薬剤がすべて含まれる。すなわち、アルカロイド、ペプチド、フエノチアジン類、ベンゾジアゼピン類、チオキサンテン類、ホルモン、ビタミン、抗けいれん薬、抗精神病薬、制吐剤、麻酔薬、催眠薬、食欲減退剤、トランクライザー、麻痺緩和剤、冠状動脈拡張剤、抗痙攣薬、抗生物質、抗菌剤、抗ウイルス薬、抗マラリア薬、炭酸脱水酵素阻害剤、非ステロイド抗炎症剤、血管収縮剤、コリン作用薬、コリン拮抗薬、アドレナリン作用

-47-

薬、アドレナリン拮抗薬、麻酔拮抗薬。

この発明において列挙され、エステルを用いて関係のある塩基性の窒素と化合した基を有する薬剤はすべて例として引用され得る。

この発明の特定の態様によると、新規ヒアルロン酸エステルおよびその塩は、治療活性物質の優れた担体として用いられ得る。このため完全なエステルまたは部分エステル、部分エステルで残りのカルボキシル基が例えば治療上許容されるが生物学的に不活性な前述の物質の1種、特にアルカリ金属、例えばナトリウムとの塩となっているものを用いることができる。これらは2種の成分を組み合わせてなる前述の薬剤である。すなわち、

成分(1)―薬理活性物質または2種またはそれ以上の活性物質の組み合わせ、および、

成分(2)―ヒアルロン酸とアルコールとの完全または部分約エステル、またはこのような部分エステルと有機もしくは無機塩基との塩を含む、さらに所望によりヒアルロン酸またはヒアルロン酸と無機もしくは有機塩基との塩を含む担体。

-48-

これらの薬剤に用いられるヒアルロン酸エステル類はとりわけエステル化するアルコールがそれ自体薬理活性をもたない、例えば前記の単純脂肪族アルコールであるものである。このタイプの薬剤の場合例えばアルコールは前記の単純脂肪族アルコールであるがエステルは薬理活性を示す。エステルも薬理活性を示すタイプの薬剤はこの発明の態様から除外されず、例えば薬理活性を有するアルコール由来の前記エステルの1種が挙げられる。

同様に、この発明はまた成分(2)のエステルも治療活性塩基との塩にされたタイプの薬剤も含む。これらの塩基はヒアルロン酸エステルを担体とする同じ薬理活性物質であり得、したがってこの場合の混合物は後述するように、可能なならば過剰量の活性塩基成分(1)の存在中、ヒアルロン酸部分エステルと治療活性塩基による塩を含む。他方担体の対象物質が塩基性ではなく、またヒアルロン酸エステルの遊離カルボキシル基がさらに治療活性塩基により塩にされた場合もあり得る。

-49-

-17-

-50-

したがって阻体としてヒアルロン酸エステルを用いることにより1)薬理活性物質または2種もしくはそれ以上の薬理活性物質の組み合わせおよび2)前記ヒアルロン酸エステルまたはその塩の1種を含む、前記の新規薬剤の製造が可能となり、またこれらの薬剤もこの発明の別の対象となる。このような薬剤においてH Y部分エステルを用いる場合、残りのカルボキシル基を塩にするためには好ましくは治療上中性の組織または有機塩基、特にナトリウムのようなアルカリ金属またはアンモニウムを用いて行なう。例えばアミン基を有する抗生物質のように活性物質成分(1)またはこれらの物質の組み合わせが塩基性基を含む場合、およびヒアルロン酸部分エステルを残りの遊離カルボキシル基と共に用いる場合、対応する塩はカルボキシル基および前記塩基性物質間で形成される。したがって新規薬剤は特に塩基性の薬理活性物質により部分的および全体的に塩にされたヒアルロン酸の部分エステルを含む。前記のように、成分(1)が局所用薬理活性物質である上記のタイプの

-51-

運送感染を感染症の治療に当てはまる。これらの3種の疾病の場合、特定の病因によるものと考えられ、さらに詳しくは、牛の場合に関係のある主たる微生物はモラクセラ・ボリス(*Moraxella bovis*)であると思われる。[ただし、他のウイルス性病原体も除外すべきではなく、例えばリノトラケイダス(*Respiratory syncytial virus*)ウイルス、羊におけるマイコプラズマ(*Mycoplasma*)、リケッチア(*Rickettsia*)およびクラミジア(*Chlamidia*)、並びに山羊におけるリケッチア(*Rickettsia*)がある]。疾病そのものが急性な形で現れ、急速に広がるが多い。初めの段階における徴候は眼瞼の腫れおよび過度の涙液、次いで化膿性分泌物、結膜炎および角膜炎を特徴とし、しばしば発熱、食欲喪失および乳の分泌低下ともなる。最終的に角膜自体の穿孔をひき起こすことさえあり得る角膜炎が特に深刻である。これらの疾病の臨床経過は数日から数週間におよぶことになる。

化学療法剤は広範な範囲から選択されて処置に

組み合わせ薬剤が特に重要である。

局所用薬剤の阻体としてのヒアルロン酸エステルは、新規生成物に角膜上皮との特別な適合性および優れた耐性が認められ、感作作用をともなわないことが要求される眼科において特に有用性がある。さらに、薬剤を慢性-粘着性のある濃縮溶液形態または固体形態で投与する場合、完全な透過性および角膜上皮への付着性があり、薬剤の生物学的利用能をこれまでより長く確保し、遅延効果のあるすぐれた製剤をたらす均質で安定性のある膜をえることが可能である。

例えば現在化学療法剤を含む眼科用の獣医専門薬が存在しないことを考えると、このような眼薬は獣医学分野において特に価値のあるものである。実際には、ひとを対象とした製剤を普通用いるが、これでは特定範囲の作用が必ずしも保証されるわけではなく、または処置すべき特定の状態についての考慮がなされるわけでもない。これは例えば、感染性角結膜炎、ピンクアイまたはBK(感染性うし角結膜炎)、牛、羊および山羊に普

-52-

用いられ、局所投与(しばしばステロイド抗炎症剤を併用)および全身投与の両方が行なわれ、テトラサイクリン類、例えばオキシテトラサイクリン、ペニシリン類、例えばクロキサシリンおよびベンジルペニシリン、スルホンアミド類、ポリミキシンB(ミコナゾールおよびブレデニゾロンを併用)、クロラムフェニコール、テロシリンおよびクロロマイセチン(*chloramphenicol*)が含まれる。疾病の局所処置は一見簡単であるが、なお未解決の問題であり、これはこれまで用いられてきた眼科製剤の場合何らかの理由により、涙液分泌中で抗生物質またはフルボキシドの治療有効濃度を達成するのが不可能であるからである。このことは前記動物の眼が主として伏臥した状態であることを考慮すると溶液の場合には全く当然である。しかしながら、半固体系薬剤の場合も、常用試験剤が角膜表面への付着に必要な性質をもたないため同じことがあてはまり、普通充分な高濃度の活性物質を含まないため、活性物質を完全に分配することができない(すなわち、分配勾配が存在する)。

眼科で用いられる常用眼薬のこれらの欠点は例えばスラックター等、「オーストラリアン・ペテラナリー・ジャーナル」(Austr. Vol. J.) 1982年、59(3)、69-72頁に記載されている。

この発明のエステルを用いるとこれらの障害は克服され得る。眼薬中に担体としてヒアルロン酸エステルが存在すると、事実上活性物質の濃度勾配をとまなわなげられた製剤の調製が可能となり、したがって前記製剤は完全に均質で、角膜上皮に対する完全な透過性および優れた付着性を有し、活性物質の優れた媒体性および場合により遅延作用をもたう。

勿論、新規眼薬の前述の特性は眼科以外の分野においても利用され得る。これらは皮膚科および例えば口内の粘膜疾患においても用いられ得る。さらに、これらは薬剤のように経皮吸収作用による全身効果を得るためにも用いられ得る。これらの適用はすべてひとを対象とする医学および獣医学の両方に可能である。ひとを対象とする場合新規眼薬は特に小児科で用いるのに適している。

-55-

による場合にも作用する前述のタイプの組み合わせられた薬剤に対して、適用部位への薬剤吸収を有利にすることから適したものといえる。したがって新規眼薬は既述した分野以外に事実上すべての医療領域、例えば心臓血管系の病変、呼吸器系、消化器系、腎臓系の感染症、内分泌系の病気の場合の内科、腫瘍学、精神科において適用され得、したがってまた、前記薬剤の特異作用の観点から、麻酔薬、鎮痛薬、抗炎症剤、創傷治療薬、抗菌剤、アドレナリン作用薬および拮抗薬、細胞増殖抑制剤、抗リウマチ薬、抗高血圧薬、利尿剤、性ホルモン剤、免疫刺激剤および免疫抑制剤に分類され得、例えば一薬剤はこの発明によりエステル化成分として用いられる治療活性アルコールまたは遊離カルボキシル基を塩にするために用いられる治療活性塩基について既述された活性を有することになる。

この発明によると、前記薬剤の成分(1)はまた多くの公知薬剤に含まれるように2種またはそれ以上の活性物質の組み合わせでもあり得る。

したがってこの発明は特にこれらの治療適用例をすべて包含する。

簡潔にするために、以後この発明による成分(1)の活性物質について述べる場合、1種またはそれ以上の活性物質を組み合わせたものも含むものとして理解されたい。

前記成分(1)はまず第一に狭き治療分野における用途について、ひとを対象とする医療および獣医療領域の区別から出発しては、例えば局所用途の場合眼科、皮膚科、耳鼻咽喉科、婦人科、尿管学科、神経科または例えば直腸適用のような局所適用により処置され得るあらゆるタイプの内臓器官の病変に関する内科という具合に処置される器官または組織に関する様々な適用分野を明確化することにより定義され得る。

またヒアルロン酸エステルの眼薬剤としての作用も、活性物質が局所的または経鼻もしくは経腸吸収、例えば鼻スプレーまたは口腔もしくは咽喉吸入製剤による場合だけでなく、経口または経経口経路、例えば筋肉内、皮下もしくは静脈経路

-56-

眼科領域に関する適応例は、例えば角膜、炎症、創傷治癒および抗腫作用であり得る。

この発明による眼薬に用いられる薬理活性物質の例としては、塩基性および非塩基性抗生物質、例えばアミノグリコシド類、マクロライド類、テトラサイクリン類およびペプチド類、例えばゲンタマイシン、ネオマイシン、ストレプトマイシン、ジヒドロストレプトマイシン、カナマイシン、アミカシン、トブラマイシン、スペクトノマイシン、エリスロマイシン、オレオンドマイシン、カルボマイシン、スピラマイシン、オキシテトラサイクリン、ロリテトラサイクリン、バシラシン、ポリミキシンB、グラミシジン、コロシチン、クロラムフェニコール、リンコマイシン、バンコマイシン、ノボボシチン、リストセチン、クリンダマイシン、アンフオテリシンB、グリセオフルビン、ニスタチン、並びに可能なならばそれらの塩、例えば硫酸塩または硝酸塩が挙げられ、またこれらの範囲内での組み合わせまたは次に列挙するもののような他の活性成分との組み合わせもある。

この発明により有利に用いられる他の医薬としては、他の抗感染薬、例えばジエチルカルバマジン、メベンダゾール、スルファミド類、例えばスルファセタミド、スルファジアジン、スルフイソキサゾール、抗ウイルス剤および抗腫瘍剤、例えばヨードデオキシウリジン、アデニシアラビノシド、トリフルオロチミジン、アシクロビル(acyclovir)、エチルデオキシウリジン、プロモビニルデオキシウリジン、5'-ヨード-5'-アミノ-2',5'-ジデオキシウリジン、ステロイド抗炎症剤、例えばデキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、フルオロメタゾン、メドリゾンおよび可能なならばこれらのエステル類、例えば硝酸エステル、非ステロイド抗炎症剤、例えばインドメタシン、オキシフェンブタゾン、フルビプロフェン、創傷治癒剤、例えば表皮成長因子、EGF、局所麻酔薬、例えばベノキシネート、プロパライオンおよび可能なならばこれらの塩、コリン作用薬、例えばピロカルピン、メトコリン、カルボミルコリン、アセクリジン、フィソスチグミン、

-58-

イシン、グラミシジンおよびこれらを含むしたもの、抗菌剤および消毒薬についてはニトロフルルゾン、マフエニド、クロルヘキシジンおよび8-ヒドロキシキノリン誘導体および可能なならばこれらの塩、抗炎症剤の場合は特にコルチコステロイド、例えばプレドニゾン、デキサメタゾン、フルメタゾン、クロベタゾール、トリアムシロンアセトニド、ベタメタゾンおよびこれらのエステル類、例えばバレレート、ペンゾエート、ジプロピオネート、細胞毒性剤についてはフルオロウラシル、メトトレキセート、ブドフィリン、麻酔薬の場合はジブカイン、リドカイン、ベンゾカインである。

勿論上記リストは例としてあげているのにすぎず、文献に記載された他の薬剤を用いることもできる。

皮膚科で用いられる薬剤の組み合わせとしては様々な抗生物質、例えばエリスロマイシン、ゲンタマイシン、ネオマイシン、グラミシジン、ポリミキシンB、この範囲内で組み合わせたものまた

ネオスチグミン、デメカリウムおよび可能なならばこれらの塩、コリン作用拮抗薬、例えばアトロピンおよびその塩、アドレナリン作用薬、例えばノルアドレナリン、アドレナリン、ナファゾリン、メトキサミンおよび可能なならばこれらの塩、アドレナリン作用拮抗薬、例えばプロパノロール、チモロール、ビンダロール、ツプラノロール、アテノロール、メトプロロール、オクスプレノロール、ブタクトール、ブトキサミン、ソタロール、ブタスリン、ラベトロールおよび可能なならばこれらの塩が挙げられる。

皮膚科において単独で用いられる活性物質またはその範囲内で組み合わせたものまたは他の活性成分と組み合わせたものの例としては、治療剤、すなわち抗感染薬、抗生物質、抗菌剤、抗炎症剤、細胞増殖抑制剤、細胞毒性剤、抗ウイルス剤、麻酔剤、および予防薬、例えば日焼け止め剤、脱臭剤、防腐剤および消毒薬がある。抗生物質の中で特に重要なのはエリスロマイシン、バシラシリン、ゲンタマイシン、ネオマイシン、オーレオマ

-59-

は抗炎症剤とこれらの抗生物質を組み合わせたもの、例えばコルチコステロイド類、例えばヒドロコルチゾン+ネオマイシン、ヒドロコルチゾン+ネオマイシン+ポリミキシンB+グラミシジン、デキサメタゾン+ネオマイシン、フルオロメトロン+ネオマイシン、プレドニゾン+ネオマイシン、トリアムシロン+ネオマイシン+グラミシジン+ニスタチン、または皮膚用常用剤に用いられた他の組み合わせがある。

勿論様々な活性物質の組み合わせはこの範囲に限定されるわけではないが、前述の各医療分野において当該分野の公知医薬製剤に既に使用されているものと類似の組み合わせを用いることができる。

前記の塩基性成分(1)を用いる場合において、部分的ヒアルロン酸エステルにより形成される塩は(エステルの方が過剰量で用いられるため)、様々なタイプとなり得る、すなわち、残りのカルボキシル基全部が塩にされるかまたは1部分だけが塩にされることによりエステル類、酸性塩、また



はエステル、中性塩をもたらし得る。遊離状態で存続する酸性基の数は特定のpH値を有する医薬を製造する場合に重要となり得る。逆に、過剰量の塩基性成分(1)を用いることも可能であり、この場合ヒアルロン酸エステル中自由カルボキシル基はすべて塩基により塩にされている。

この発明の特定態様によると、予め単離し、可能ならば固体無水物状態に精製した塩から出発し、無定形粉末として、処理すべき組織と接触する粘潤性および弾性を特徴とする溶液をもたらすタイプの薬剤を製造することが可能である。これらの特性はかなり希釈された液体の場合でも維持されるため、前述の塩水塩の代わりに水または塩水中適度に濃縮した溶液を、さらに可能ならば他の賦形剤または添加剤、例えばpHおよび浸透圧を一定にするような他の無機塩を加えて使用することができる。勿論、ゲル、インサート、クリームまたは軟膏を製造する場合にまた塩も、これらの医薬製剤の常套的処方用いられる他の賦形剤または成分をも含めて使用することができる。

-83-

フリン+デクサメタゾンホスフェート、カナマイシン+ベタメタゾンホスフェート+フェニレフリン、または眼科で使用される他の抗生物質、例えばロリテラサイクリン、ネオマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリンとの同様な組み合わせ。

単一活性物質成分(1)の代わりに前述したもののよう活性物質の組み合わせを用いる場合、塩基性活性物質およびヒアルロン酸部分エステルによる塩は1種またはそれ以上の前記塩基性物質による混合塩または可能性としてはある数の多量の他の酸基が前述の金属または塩基により塩にされたタイプの混合塩であり得る。例えば、ヒアルロン酸または分子フラクションヒアラスチン(Hyalastine)もしくはヒアレクチン(Hyalactin)の一方と薬理学的に不活性なアルコール、例えば低級アルコールとの部分エステルの塩を製造するうえである、比率で抗生物質カナマイシンにより塩にされた酸基が存在し、別の比率で血管収縮剤フェニレフリンにより塩にされたカルボキシル基が

しかしながらこの発明の主たる態様によると、ヒアルロン酸エステルまたはその塩類を担体として治療上活性または不活性な物質と共に含有する薬剤が単独で使用される(ただし水性溶液は用いない)。またこの発明にはこの明細書中に記載したあらゆるタイプの薬剤から得られる混合物、その範囲内の薬剤の混合物およびまた可能性として遊離ヒアルロン酸による新規ヒアルロン酸エステルの混合物またはその塩類(例えばナトリウム塩)の混合物も含まれる。

この発明による成分(1)または2種またはそれ以上のこれらの薬剤および可能性として他の成分との組み合わせ剤または混合物ともなり得る。例えば眼科の場合、一薬剤を抗生物質または消炎性物質および血管収縮剤または数種の抗生物質、1種またはそれ以上の消炎剤、または1種またはそれ以上の抗生物質、散瞳薬または縮瞳薬または創傷治療剤または抗アレルギー剤等と組み合わせることができる。例えば次の組み合わせの医薬が用いられ得る。すなわち、カナマイシン+フェニレ

-84-

存在し、残りの比率で例えば酸基がナトリウムまたは他の前記金属の1種による塩から遊離し得る状態が可能である。また、前記多量エステルと単一活性物質との塩を含有する薬剤について既に示唆したように、前記タイプの混合塩を遊離ヒアルロン酸またはそのフラクションまたはそれらの金属塩と混合することも可能である。

眼科および皮膚科について検討した例の中から類推することにより、この発明による薬剤が前述の医学分野、例えば耳鼻咽喉科、歯科または内科、例えば内分泌科において用いられ得ることがわかる。したがって、このような製剤は例えば眼科に関して既述したように抗炎症剤、血管収縮剤または血管圧縮剤、ビタミン剤、抗生物質、例えば前述したもの、ホルモン剤、化学療法剤、抗菌剤等、皮膚科において用いられる前述のものであり得る。

ヒアルロン酸エステルと薬理活性物質の組み合わせ薬剤は他の医薬担体、例えばヒアルロン酸エステルだけを含む医薬製剤に関して後述するものを含有し得、軟膏、クリーム、パステル、ゼラチ

ンカプセル剤、カプセル剤、水性または油性溶液スプレー剤、坐剤等の形態をとり得る。しかしながらこの発明の特定態様によると、成分(1)および(2)(ただし成分(2)は水性溶液のような可能な溶媒以外の単一賦形剤とする)の組み合わせを含む薬剤を用いるのが好ましい。

この発明の薬剤の中で特に重要なものは各場合について適用される環境に適した酸性度を有するもの、すなわち生理学的に耐性のあるpH値を有するものである。例えばヒアルロン酸部分エステルと塩基性活性物質との前述の塩におけるpHの調節は、好適には多量、塩および塩基性物質自体の量を調節することにより行なわれ得る。すなわち例えばヒアルロン酸部分エステルと塩基性活性物質の塩の酸性度が高過ぎる場合、過剰量の遊離酸基を前述の塩の塩基、例えばナトリウム、カリウムまたはアンモニウムの水和物により中和することができる。

#### この発明のH-Yエステルの製造方法 方法A

-67-

溶媒、例えばケトン、エーテル、例えばジオキサンまたは中性溶媒、例えばジメチルスルホキシド中でも行なわれ得る。塩基として例えばアルカリもしくはアルカリ土類金属またはマグネシウム水和物または酸化銀またはこれらの金属の1種の塩基性塩、例えば炭酸塩、および有機塩基の場合、第三級アル化塩基、例えばトリジンまたはコリジンを用いることができる。塩基の代わりに塩基性型イオン交換剤を用いることもできる。

別のエステル化方法では金属塩または有機アルコキシ塩、例えばアンモニウムまたはアンモニウム置換塩基が用いられる。好ましくは、アルカリまたはアルカリ土類金属塩を用いるが、他の金属塩も用いることができる。この場合もまたエステル化剤は前述のものであり、溶媒も同様である。中性溶媒、例えばジメチルスルホキシドおよびジメチルホルムアミドを用いるのが好ましい。

この方法または後述する他の方法により得られたエステルにおいて部分エステルの遊離カルボキシル基は所望により自体公知の方法で塩にされ得

る。この発明によるとヒアルロン酸エステルはカルボン酸のエステル化について自体公知の方法、例えば遊離ヒアルロン酸を触媒物質、例えば無機強酸または酸タイプのイオン交換剤の存在下所望のアルコールにより処理するかまたは塩様もしくは有機塩基の存在下所望のアルコールをもたらす得るエーテル化剤により処理することにより製造され得る。エーテル化剤としては文献で公知のもの、例えば特に様々な無機酸または有機スルホン酸、例えば水素酸のエステル類、すなわちハロゲン化炭化水素残基、例えばロウ化メチルもしくはエチル、または中性遊離エステルまたは炭化水素残基、アルファイト(alfite)、カーボネート、シリケート、ホスファイトまたはスルホン酸炭化水素残基、例えばメチルベンゼンまたはp-トルエンスルホネート、またはクロロスルホン酸メチルまたはエチルを用いることができる。この反応は適当な溶媒、例えば好ましくはカルボキシル基において導入されるアルキル基に対応するアルコール中で行なわれ得る。しかしこの反応はまた非極性

-68-

る。

#### 方法B

しかしながらこの発明によるとヒアルロン酸エステルはカルボキシル基を有する酸性多糖類のカルボン酸エステルの製造に一般に適用され得る第2の方法にしたがう方が有利に製造され得る。この方法は好ましくは中性有機溶媒中カルボキシル基を有する酸性多糖の第四級アンモニウム塩をエーテル化剤で処理することからなる。出発物質の酸性多糖類として例えば、ヒアルロン酸以外に動物性または植物性の他の酸性多糖類およびこれらの合成修飾誘導体、例えばある種の植物のアルカリ抽出物からキシランの沈澱液に得られる酸性ヘミセルロース(ただしこれの二糖成分はD-グルクロン酸およびD-キシロビラースからできている)、「[クマンによる「ザ・カーボハイドレート」(The Carbohydrates)、668-669頁-ウイストラ、フォルベット参照]、同様のものから得られるペクチンおよび酸性多糖類、すなわち、植物性樹脂(抽出物)から得られるガラクトナン

(galacturonic), 酸性多糖類、例えばアラビガム、トラガカントガム、並びに最後に海藻、例えば寒天およびカラゲニンから得られる酸性多糖類を用いることができる。勿論、出発物質として前述のすべての多糖類の減成により得られる分子フラクションを用いることもできる。

有機溶媒として、非プロトン性溶媒、例えばジアルキルスルホキシド類、ジアルキルカルボキシアミド類、例えば特に低級アルキルジアルキルスルホキシド類、特にジメチルスルホキシド、および低級脂肪酸の低級アルキルジアルキルアミド類、例えばジメチルもしくはジエチルアセトアミドを用いるのが好ましい。

しかしながら必ずしも非プロトン性ではない他の溶媒、例えばアルコール類、エーテル類、ケトン類、エステル類、特に低沸点の脂肪族または複素環式アルコール類およびケトン類、例えばヘキサフルオロイソプロパノール、トリフルオロエタノールおよびN-メチルピロリドンの使用も考えられる。

-11-

出液を凍結乾燥することにより得ることができる。新規方法の出発化合物として用いられ、低級アルキル、特に1個ないし6個の炭素原子を有するアルキル基から得られる酸性多糖類のテトラアルキルアンモニウム塩は新規のものであり、この発明のもう1つの対象を構成する。驚くべきことにこのような塩は前述の有機溶媒に可溶性であるため、前述の方法により酸性多糖類のエステル化は特に容易であり、収量も多い。したがってこの方法を採用する場合のみ、エステル化されるべき酸性多糖のカルボキシル基の数を正確に調整することができる。

新規方法Bはこの発明によるヒアルロン酸エステルの製造に特に通じている。したがって特に、新規方法の出発化合物として、ヒアルロン酸第四級アンモニウム塩、特に低級アルキル、特に1個ないし6個の炭素原子を有するアルキル基から得られるものは新規であり、この発明の特定態様を形成する。

前記方法の一度法は、触媒量の第四級アンモニウム塩、例えば約0℃ないし100℃、特に約25℃ないし75℃の温度範囲、例えば約30℃で行なわれる。

エステル化は、前述の溶媒の1つ、例えばジメチルスルホキシド中前記アンモニウム塩にエステル化剤を徐々に加えることにより行なうのが好ましい。

アルキル化剤として前述のもの、特にハロゲン化炭化水素残基、例えばハロゲン化アルキルを用いることができる。出発物質の第四級アンモニウム塩として好ましくは1個ないし6個の炭素原子を有するアルキル基を含むテトラ(低級)アルキルアンモニウム塩を用いるのが好ましい。ヒアルロン酸テトラアルキルアンモニウムが最も用いられる。酸性多糖類の金属塩、好ましくは前述したもの、特にナトリウムまたはカリウム塩を水溶液中第四級アンモニウム塩基による塩形をしたスルホン酸樹脂と反応させることにより前記の第四級アンモニウム塩を製造することができる。

酸性多糖のテトラアルキルアンモニウム塩は溶

-12-

ウム塩、例えばテトラアルキルアンモニウムヨードの存在下適当な溶媒、例えばジメチルスルホキシドにけん固した酸性多糖カリウムまたはナトリウム塩を適当なアルキル化剤と反応させることを含む。

この発明による新規エステルを製造する場合、例えば雄二ワトリのときのような前述の天然出発物質から抽出された酸のごときヒアルロン酸を用いることができる。このような酸の製造は文献に記載されている。好ましくは精製されたヒアルロン酸が用いられる。この発明によると、分子量が1300万の完全な酸の広い範囲の分子量、例えば約90%~80%(分子量=1170万~1040万)~0.2%(分子量=30000)、好ましくは5%ないし0.2%の範囲内で変化する分子量を有する有機物質の抽出により直接得られる完全な酸の分子フラクションを含むヒアルロン酸が特に用いられる。このようなフラクションは文献に記載された様々な方法、例えば加水分解、酸化、酵素的または物理的方法、例えば機械的または放

-13-

-23-

-14-

射による方法により得ることができる。したがって原始抽出物がこれらの精製工程中しばしば同時に形成される〔例えば「コスメティクス・アンド・トイレットリーズ」(Cosmetics & Toiletries)で引用されたバラッソ等による論文参照〕。得られた分子フラクションの分離および精製は公知技術、例えば分子濾過により行なわれる。

この発明による用途に適した精製H Yのフラクションの1つは例えば、「非炎症性-N I F-N a H A」ヒアルロン酸ナトリウムとして知られているものがあり、小冊子「ヒーロン」(Healon)においてバラッソにより記載されている〔眼科手術における用途のガイド、ミラーおよびステクマン著、ジョン・ウィリー・アンド・ソンス、ニューヨーク、81983、5頁〕。

この発明のエステルにおける出発物質として特に重要なのはヒアルロン酸から得られる2種の精製フラクション、例えば塩ニワトリのときから抽出されるもので、「ヒアラスチン」(Hyalastine)および「ヒアレクチン」(Hyalactin)として知られ

-75-

論的割合で塩が得られるような量の塩基を投じて残りのカルボキシル基全部または一部分のものを塩に変えることが可能である。正確な割合で塩に変えることにより広範囲にわたる様々な解離定数を有するエステルを得られ、従って治療適用時に溶液として、または「その場で」所望のpH値をもたらしすることができる。

この発明の新規生成物の中で特に重要なのは、前記のエステル類およびその塩類並びに後記実施例記載のものである。

またこの発明は新規エステル類およびそれらの塩の製造手順の修正法をも包含するものであり、このような手順はいずれかの段階で中断されたりまたは中間体化合物から出発して残りの段階を続行したり、出発生成物がそのままで生成されたりする。

以下、実施例をあげてこの発明を説明するが、それらの実施例によりこの発明を限定するわけではない。

〔製造例〕

ているものである。ヒアラスチンフラクションの平均分子量は約50000ないし100000であり、ヒアレクチンフラクションの平均分子量は約50000ないし730000である。これら2種のフラクションを合わせたフラクションもまた分離され、平均分子量が約250000〜約350000であることを特徴とする。この合わせたフラクションは特定の出発物質から得られるヒアルロン酸全体の80%の収率で得られるが、ヒアレクチンフラクションは出発H Yの30%の収率およびヒアラスチンフラクションは50%の収率で得ることができる。これらのフラクションの製造については実施例A-Cに記載する。

既述したこの発明による特定のエステル化方法における出発塩を製造するために、自体公知の方法、例えばH Yを懸濁液の塩基、例えばアルカリ金属水和物または前記金属の塩基性塩、例えば炭酸塩または重炭酸塩と反応させることにより、H Yと前記金属との塩を生成する。

この発明の部分エステルの場合、所望の化学量

-76-

以下、実施例A-Cによりこの発明で使用方法を好ましいヒアルロン酸フラクションの製造方法を説明する。

実施例A

炎症作用を伴わないヒアラスチンおよびヒアレクチンフラクションの混合物を得る方法。

新鮮であるかまたは冷凍した塩ニワトリのとき(3000g)を肉引き機で切り割り、次いで機械的ホモジナイザーで注意深くホモジナイズする。こうして得られたペーストをステンレス製容器A I S I 316またはガラス器に入れ、10容量の無水アセトンにより処理する。全体を50rpmの速さで6時間攪拌する。これを12時間放置して分離させ、アセトンをサイホンで吸い上げることにより除く。除去されたアセトンが正確な温度に達するまでアセトン抽出を繰り返す(カール-フィッシャー法)。次いで全体を遠心分離し、適当な温度で5-8時間真空乾燥する。こうして約500〜600gの乾燥粉末状の塩ニワトリのときを得る。

-77-

-24-

-78-

300グラムの乾燥粉末を適量の塩酸ステン  
の存在下塩酸緩衝液で懸濁状態にした、水性条  
件下のバイン(0.2g)による酵素消化にさらす。  
得られたものを60rpmの速さで24時間60～  
65℃の一定温度を維持しながら振盪する。次い  
でこれを25℃に冷却し、セライト(Celite)6  
0グラムをさらに1時間振盪を続けながら加える。  
澄明な液体が得られるまで得られた混合物を濾過  
する。次いで膜上に分子量が30000より大き  
い分子が残るように、分子排除限界30000の  
膜を用いて前記の澄明な液体を分子限外濾過にか  
ける。

限外濾過中の生成物に頻りに蒸留水を加えなが  
ら生成物を当初の5～6倍容量から限外濾過する。  
水を加えることにより徐々に、容量が最初の容  
量の3分の1に減少するまで限外濾過を続ける。

液体残留物を、塩化ナトリウムを加えることに  
より0.1Mにし、温度を50℃まで高める。6  
0rpmで振盪しながら45gのセチルビリジニウム  
クロリドを加える。60分間これを振盪し、次い

で50gのセライト(Celite)を加える。振盪しな  
がら全体の温度を25℃にし、遠心分離により生  
成した沈殿を集める。得られた沈殿を、0.05  
%のセチルビリジニウムクロリドを含有する塩化  
ナトリウムの0.05M溶液(5リットル)にけん  
濁する。生成したけん濁液を50℃で60分間振  
盪する。次いで温度を25℃にし、沈殿を遠心分  
離する。洗浄操作を3回繰り返した後、0.05  
%セチルビリジニウムクロリドを含有する塩化ナ  
トリウムの0.05M溶液3リットルの入った容  
器に沈殿を集める。これを60分間60rpmで振  
盪し、2時間25℃の一定温度を保つ。上清を遠  
心分離により除去する。0.05%セチルビリジ  
ニウムクロリド含有0.1M塩化ナトリウム溶液  
を用いてこの処理を放回繰り返す。混合物を遠心  
分離し、上清を捨てる。0.05%セチルビリジ  
ニウムクロリド含有0.3M塩化ナトリウム溶  
液(3リットル)に沈殿を分散させる。混合物を振  
盪し、沈殿および澄明な液体の両方を集める。沈  
殿についてはさらに3回各回とも同じ水溶液0.

-78-

5リットルを用いて抽出を繰り返す。

最後に沈殿残留物を除去し、澄明な溶液を単一  
容器にすべて一掃して入れる。液体の温度を換  
えず振盪しながら50℃にする。次いでこの液体  
に塩化ナトリウムを加えて0.23Mにする。1  
グラムのセチルビリジニウムクロリドを加え、1  
2時間振盪を続ける。

混合物を25℃に冷却し、次いでまずセライト  
バックで濾過し、次にフィルターに通して濾過す  
る。次いで、分子排除限界30000の膜で再び  
分子限外濾過を行なうが、このとき0.33M塩  
化ナトリウム溶液を加えることにより当初の3倍  
容量を限外濾過する。塩化ナトリウムを加えるの  
を中止し、容量を当初の容量の4分の1に減らす。  
こうして濃縮された溶液を3倍容量のエタノール  
(95%)により25℃で振盪(60rpm)下沈殿さ  
せる。沈殿を遠心分離により集め、上清を捨てる。  
沈殿を1リットルの0.1M塩化ナトリウム溶液  
に溶かし、3容量の95%エタノールを用いて沈  
殿を繰り返す。

-81-

-80-

沈殿を集め、まず75%エタノール(3回)、次  
に無水エタノール(3回)および最後に無水アセト  
ン(3回)で洗浄する。

こうして得られた生成物(ヒアラスチン+ヒア  
レクチンフラクション)は250000～350  
000の平均分子量を有する。

HYの収率は当初の新鮮な組織の0.6%であ  
る。

#### 実施例B

実施例A記載の方法により得られた混合物から  
ヒアラスチンフラクションを得る方法。

実施例A記載の方法により得られた混合物を水  
1mlに対し生成物10gの割合で再蒸留非発熱水  
に溶解する。得られた溶液を、分子排除限界20  
0000の濾過膜による分子濾過にかけ、水を加  
えずに膜上濃縮技術を行なう。分子排除限界20  
0000の膜を通す限外濾過工程中、20000  
0より多い分子量の分子は通過しないが、これよ  
り小さい分子は水と一緒に膜を通る。濾過工程  
中水は一切加えないため、容量は減少し、したがっ

-82-

て20000より多い分子量の分子の濃度は増加する。膜の上部の容量が当初の容量の10%に減少するまで生成物を限外濾過する。2倍容量の非発熱性再蒸留水を加え、次いで容量が3分の1に減少するまで再び限外濾過を行なう。さらに2回この操作を繰り返す。膜を通過した溶液に塩化ナトリウムを加えて0.1Mとし、次いで4倍容量の95%エタノールにより沈澱させる。この沈澱を75%エタノールで3回洗浄し、次に真空乾燥する。

こうして得られた生成物(ヒアラスチンフラクション)の平均分子量は50000ないし100000である。HYの収率は当初の新鮮な組織の0.4%に等しい。

#### 実施例C

ヒアレクチンフラクションを得る方法。

実施例Bに記載したように分子排除限界20000の限外濾過膜上部の容器に集められた濃縮溶液を水で希釈して5mg/mlのヒアルロン酸含有溶液を得るが、この測定はグルクロン酸の用量に

基づく定量分析により行なわれる。

溶液に塩化ナトリウムを加えて0.1Mとし、次いで4倍容量の95%エタノールにより沈澱させる。この沈澱を75%エタノールで3回洗浄し、次いで真空乾燥する。

こうして得られた生成物(ヒアレクチンフラクション)の平均分子量は50000ないし730000である。これは高純度のサッカライド単位約2500~3500個からなる限定された分子鎖長を有するヒアルロン酸の特異的フラクションと一致する。HYの収率は当初の新鮮な組織の0.2%に等しい。

#### 実施例D

ヒアルロン酸(HY)のテトラブチルアンモニウム塩の製造。

HYナトリウム塩(10ミリ当量)4.02gを400mlの蒸留H<sub>2</sub>Oに溶解する。次いでこの溶液を4℃でテトラブチルアンモニウム形のスルホン酸樹脂(ダウエックス(Dowex)50×8)15ml含有サームスットカラム中で溶解する。ナトリ

-83-

ウムを含まない溶出液を直ちに冷凍し、凍結乾燥する。収量6.18g。

#### 実施例1

ヒアルロン酸(HY)の(部分的)アロピルエステル(50%のエステル化されたカルボキシル基-50%の(Na)塩にされたカルボキシル基)の製造。  
20ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量170000のHYテトラブチルアンモニウム塩12.4gを25℃で620mlのジメチルスルホキシドに溶解し、1.8g(10.6ミリ当量)のヨロプロピルを加え、生成した溶液を12時間30℃の温度に保つ。

水62mlおよび塩化ナトリウム9gを含む溶液を加え、生成した混合物を絶えず攪拌しながらゆっくりと500mlのアセトンに注ぐ。生成した沈澱を濾過し、500mlのアセトン/水(5:1)で3回およびアセトンで3回洗浄し、最後に8時間30℃で真空乾燥する。

次いで1%塩化ナトリウム水溶液550mlに生成物を溶解し、溶液を絶えず攪拌しながら300

-84-

0mlのアセトンにゆっくりと注ぐ。生成した沈澱を濾過し、500mlのアセトン/水(5:1)で2回および500mlのアセトンで3回洗浄し、最後に30℃で24時間真空乾燥する。7.9gの標記部分的アロピルエステル化合物が得られる。クンディフおよびマルクナスの方法(アナリティカル・ケミストリー(Anal. Chem.) 33巻、1028-1030頁(1961年))によりエステル基の定量測定を行なう。

#### 実施例2

ヒアルロン酸(HY)の(部分的)イソプロピルエステル(50%のエステル化されたカルボキシル基-50%の(Na)塩にされたカルボキシル基)の製造。

20ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量160000のHYテトラブチルアンモニウム塩12.4gを25℃で620mlのジメチルスルホキシドに溶解し、1.8g(10.6ミリ当量)のヨロプロピルを加え、生成した溶液を12時間30℃に保つ。

-85-

-26-

-86-

水6.2gおよび塩化ナトリウム9gを含有する溶液を加え、生成した混合物を350.0mgのアセトンに絶えず攪拌しながらゆっくりと注ぐ。生成した沈澱を濾過し、50.0mgのアセトン/水(5:1)で3回およびアセトンで3回洗浄し、最後に30°で8時間真空乾燥する。

次いで生成物を1%塩化ナトリウム水溶液55.0mgに溶解し、溶液を300.0mgのアセトンに絶えず攪拌しながらゆっくりと注ぐ。生成した沈澱を濾過し、50.0mgのアセトン/水(5:1)で2回および50.0mgのアセトンで3回洗浄し、最後に30°で24時間真空乾燥する。7.8gの標記部分イソプロピルエステル化合物が得られる。クンディフおよびマルクナスの方法〔アナリティカル・ケミストリー(Anal.Chem.)33巻、1028-1030頁(1961年)]によりエステル基の定量測定を行なう。

#### 実施例3

ヒアルロン酸(HY)の(部分)エチルエステル(エステル化されたカルボキシル基75%(Na))

-87-

マルクナスの方法〔アナリティカル・ケミストリー(Anal.Chem.)33巻、1028-1030頁(1961年)]を用いてエステル基の定量測定を行なう。

#### 実施例4

ヒアルロン酸(HY)の(部分)メチルエステル(エステル化されたカルボキシル基75%(Na))塩にされたカルボキシル基25%の製造。

2.0ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量80000のHYテトラブチルアンモニウム塩12.4gを25°で62.0mgのジメチルスルホキシドに溶解し、2.26g(15.9ミリ当量)のヨウ化メチルを加え、生成した溶液を30°で12時間保つ。

6.2mgの水および9gの塩化ナトリウムを含む溶液を加え、生成した混合物を絶えず攪拌しながら350.0mgのアセトンにゆっくりと注ぐ。沈澱が生じるが、これを濾過し、50.0mgのアセトン/水(5:1)で3回およびアセトンで3回洗浄し、最後に8時間30°で真空乾燥する。

塩にされたカルボキシル基25%の製造。

2.0ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量250000のHYテトラブチルアンモニウム塩12.4gを25°で62.0mgのジメチルスルホキシドに溶解し、2.5g(15.9ミリ当量)のヨウ化エチルを加え、そして生成した溶液を12時間30°に保つ。

6.2mgの水および9gの塩化ナトリウムを含む溶液を加え、生成した混合物を350.0mgのアセトンに絶えず攪拌しながらゆっくりと注ぐ。生成した沈澱を濾過し、50.0mgのアセトン/水(5:1)で3回およびアセトンで3回洗浄し、最後に8時間30°で真空乾燥する。

次いで生成物を1%塩化ナトリウム水溶液55.0mgに溶解し、溶液を300.0mgのアセトンに絶えず攪拌しながらゆっくりと注ぐ。生成した沈澱を濾過し、50.0mgのアセトン/水(5:1)で2回および50.0mgのアセトンで3回洗浄し、最後に30°で24時間真空乾燥する。標記の部分エステル7.9gが得られる。クンディフおよび

-88-

次いで生成物を1%の塩化ナトリウムを含む水55.0mgに溶かし、この溶液を絶えず振盪しながら300.0mgのアセトンにゆっくりと注ぐ。沈澱が形成されるがこれを濾過し、50.0mgのアセトン/水(5:1)で2回および50.0mgのアセトンで3回洗浄し、最後に24時間30°で真空乾燥する。7.8gの標記部分メチルエステル化合物が得られる。クンディフおよびマルクナスの方法〔アナリティカル・ケミストリー(Anal.Chem.)33巻、1028-1030頁(1961年)]を用いてエステル基の定量測定を行なう。

#### 実施例5

ヒアルロン酸(HY)メチルエステルの製造。

2.0ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量120000のHYテトラブチルアンモニウム塩12.4gを25°で62.0mgのジメチルスルホキシドに溶解し、3g(21.2ミリ当量)のヨウ化メチルを加えて溶液を12時間30°に保つ。

生成した混合物を350.0mgの酢酸エチルに絶えず攪拌しながらゆっくりと注ぐ。生成した沈澱

を濾過し、500mgの酢酸エチルで4回洗浄し、そして最後に30°で24時間真空乾燥する。

8gの標記メチルエステル生成物が得られる。

クンディフおよびマルクナスの方法〔アナリティカル・ケミストリー(Aнал. Chem.) 33巻、1028-1030頁(1961年)]を用いてエステル基の定量測定を行なう。

#### 実施例6

ヒアルロン酸(HY)エチルエステルの製造。

20ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量85000のHYテトラブチルアンモニウム塩12.4gを25°で620mgのジメチルスルホキシドに溶解し、3.3g(21.2ミリ当量)のヨウ化エチルを加え、溶液を12時間30°に保つ。

生成した混合物を3500mgの酢酸エチルに絶えず振盪しながらゆっくりと注ぐ。沈殿が形成されるが、これを濾過し、500mgの酢酸エチルで4回洗浄し、そして最後に24時間30°で真空乾燥する。

8gの標記エチルエステル生成物が得られる。

-91-

#### 実施例8

ヒアルロン酸(HY)の(部分)ブチルエステル(エステル化されたカルボキシル基50%(Na)塩にされたカルボキシル基50%)の製造。

20ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量62000のHYテトラブチルアンモニウム塩12.4gを25°で620mgのジメチルスルホキシドに溶解し、1.95g(10.6ミリ当量)のn-ブチルヨウ化物を加え、生成した溶液を12時間30°に保つ。

62mgの水および9gの塩化ナトリウムを含む溶液を加え、生成した混合物を3500mgのアセトンに絶えず振盪しながらゆっくりと注ぐ。生成した沈殿を濾過し、500mgのアセトン/水(5:1)で3回およびアセトンで3回洗浄し、最後に8時間30°で真空乾燥する。

次いで生成物を1%の塩化ナトリウム含有水550mgに溶かし、溶液を3000mgのアセトンに絶えず振盪しながらゆっくりと注ぐ。生成した沈殿を濾過し、500mgのアセトン/水(5:1)で

クンディフおよびマルクナスの方法〔アナリティカル・ケミストリー(Aнал. Chem.) 33巻、1028-1030頁、(1961年)]を用いてエステル基の定量測定を行なう。

#### 実施例7

ヒアルロン酸(HY)プロピルエステルの製造。

20ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量170000のHYテトラブチルアンモニウム塩12.4gを25°で620mgのジメチルスルホキシドに溶解し、3.6g(21.2ミリ当量)のヨウ化プロピルを加え、溶液を12時間30°に保つ。生成した混合物を3500mgの酢酸エチルに絶えず振盪しながらゆっくりと注ぐ。生成した沈殿を濾過し、500mgの酢酸エチルで4回洗浄し、そして最後に24時間30°で真空乾燥する。

8.3gの標記プロピルエステル生成物が得られる。クンディフおよびマルクナスの方法〔アナリティカル・ケミストリー(Aнал. Chem.)、33巻、1028-1030頁、(1961年)]を用いてエステル基の定量測定を行なう。

-92-

2回および500mgのアセトンで3回洗浄し、そして最後に24時間30°で真空乾燥する。標記部分ブチルエステル化合物8gが得られる、クンディフおよびマルクナスの方法〔アナリティカル・ケミストリー(Aнал. Chem.)、33巻、1028-1030頁、(1961年)]を用いてエステル基の定量測定を行なう。

#### 実施例9

ヒアルロン酸(HY)の(部分)エトキシカルボニルメチルエステル(エステル化されたカルボキシル基75%(Na)塩にされたカルボキシル基25%)の製造。

20ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量180000のHYテトラブチルアンモニウム塩12.4gを25°で620mgのジメチルスルホキシドに溶解し、2gのテトラブチルアンモニウムヨウ化物および1.84g(15ミリ当量)のクロロ酢酸エチルを加え、そして生成した溶液を24時間30°に保つ。

62mgの水および9gの塩化ナトリウムを含む

-93-

-94-



溶液を加え、生成した混合物を3500mgのアセトンに絶えず振盪しながらゆくりと注ぐ。生成した沈澱を濾過し、500mgのアセトン/水(5:1)で3回およびアセトンで3回洗浄し、そして最後に8時間30°で真空乾燥する。

次いで生成物を1%の塩化ナトリウム含有水550mgに溶かし、溶液を3000mgのアセトンに絶えず振盪しながらゆくりと注ぐ。生成した沈澱を濾過し、500mgのアセトン/水(5:1)で2回および500mgのアセトンで3回洗浄し、そして最後に24時間30°で真空乾燥する。10gの標記部分エトキシカルボニルメチルエステル化合物が得られる。ケンディフおよびマルクナスの方法〔アナリティカル・ケミストリー(Aнал. Chem.), 33巻, 1028-1030, (1961年)]を用いてエトキシ基含有エステル基の定量測定を行なう。

#### 実施例10

ヒアルロン酸(HY)の(部分)フルクトシジルエステル(C<sub>11</sub>)(エステル化されたカルボキシル基20

-95-

後に24時間30°で真空乾燥する。4.5gの標記部分フルクトシジルエステル化合物が得られる。Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>の水性アルコール溶液により穏やかにアルカリ加水分解し、クロロホルムで抽出後、ブリティッシュ・ファーマコペイア(British Pharmacopoeia(英国薬局方), 1980年, 127頁)にしたがいフルクトシジルの定量測定を行なう。

#### 実施例11

ヒアルロン酸(HY)の(部分)ヒドロコルチゾンエステル(C<sub>11</sub>)(エステル化されたカルボキシル基20%-(Na)塩にされたカルボキシル基80%)の製造。

10ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量80000のHYテトラブチルアンモニウム塩6.2gを25°で310mgのジメチルスルホキシドに溶解し、0.85g(2ミリ当量)の21-プロモ-4-ブレンネン-11β,17α-ジオール-3,20-ジオンを加え、生成した溶液を24時間30°に保つ。

次いで100mgの水および5gの塩化ナトリウ

ム-(Na)塩にされたカルボキシル基80%)の製造。

10ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量105000のHYテトラブチルアンモニウム塩6.2gを25°で310mgのジメチルスルホキシドに溶解し、0.85g(2ミリ当量)の21-プロモ-4-ブレンネン-17α-オール-3,11,20-トリオンを加え、生成した溶液を24時間30°に保つ。

100mgの水および5gの塩化ナトリウムを含む溶液を加え、生成した混合物を2000mgのアセトンに絶えず振盪しながらゆくりと注ぐ。生成した沈澱を濾過し、100mgのアセトン/水(5:1)で3回およびアセトンで3回洗浄し、そして最後に8時間30°で真空乾燥する。

次いで生成物を1%の塩化ナトリウム含有水300mgに溶かし、溶液を1500mgのアセトンに絶えず振盪しながらゆくりと注ぐ。生成した沈澱を濾過し、100mgのアセトン/水(5:1)で2回および100mgのアセトンで3回洗浄し、最

-95-

ムを含む溶液を加え、生成した混合物を2000mgのアセトンに絶えず振盪しながらゆくりと注ぐ。生成した沈澱を濾過し、100mgのアセトン/水(5:1)で3回およびアセトンで3回洗浄し、最後に8時間30°で真空乾燥する。

次いで生成物を1%の塩化ナトリウム含有水300mgに溶かし、溶液を1500mgのアセトンに絶えず振盪しながらゆくりと注ぐ。生成した沈澱を濾過し、100mgのアセトン/水(5:1)で2回および100mgのアセトンで3回洗浄し、最後に30°で24時間真空乾燥する。4.4gの標記部分ヒドロコルチゾンエステル化合物が得られる。Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>の水性アルコール溶液で穏やかにアルカリ加水分解し、クロロホルムで抽出後、ブリティッシュ・ファーマコペイア(British Pharmacopoeia, 1980年, 224頁)にしたがいヒドロコルチジルの定量測定を行なう。

#### 実施例12

ヒアルロン酸(HY)の(部分)フルオロコルチゾンエステル(C<sub>11</sub>)(エステル化されたカルボキシ

-97-

-29-

-98-

ル基20%-(Na)塩にされたカルボキシ基80%の製造。

10ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量80000のHYテトラブチルアンモニウム塩6.2gを25°で310mlのジメチルスルホキシドに溶解し、0.89g(2ミリ当量)の9-α-フルオロ-21-プロモ-4-ブレンゲン-11β,17-α-ジオール-3,20-ジオンを加え、生成した溶液を12時間30°に保つ。

次いで62mlの水および5gの塩化ナトリウムを含む溶液を加え、生成した混合物を2000mlのアセトンに絶えず攪拌しながらゆっくりと注ぐ。生成した沈殿を濾過し、1000mlのアセトン/水(5:1)で3回およびアセトンで3回洗浄し最後に30°で8時間真空乾燥する。

次いで生成物を1%の塩化ナトリウム含有水300mlに溶かし、溶液を1500mlのアセトンに絶えず攪拌しながらゆっくりと注ぐ。生成した沈殿を濾過し、1000mlのアセトン/水(5:1)で2回および1000mlのアセトンで3回洗浄し、最

後に30°で24時間真空乾燥する。4.6gの標記部分フルオロカルチゾン化合物が得られる。Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>の水性アルコール溶液で種やかにアルカリ加水分解し、クロロホルムで抽出後、ブリティッシュ・ファーマコペイア(British Pharmacopoeia, 1980年196頁)にしたがいフルオロカルチゾンの定量測定を行なう。

#### 実施例13

ヒアルロン酸(HY)の(部分)デオキシフルトコステロンエステル(C<sub>21</sub>) (エステル化されたカルボキシ基20%-(Na)塩にされたカルボキシ基80%)の製造。

10ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量105000のHYテトラブチルアンモニウム塩6.21gを25°で310mlのジメチルスルホキシドに溶解し、0.661g(2ミリ当量)の21-プロモ-4-ブレンゲン-3,20-ジオンを加え、生成した溶液を24時間30°に保つ。

次いで100mlの水および5gの塩化ナトリウムを含む溶液を加え、生成した混合物を2000

-99-

mlのアセトンに絶えず攪拌しながらゆっくりと注ぐ。生成した沈殿を濾過し、1000mlのアセトン/水(5:1)で3回およびアセトンで3回洗浄し最後に30°で8時間真空乾燥する。

次いで生成物を1%の塩化ナトリウム含有水300mlに溶かし、溶液を1500mlのアセトンに絶えず攪拌しながらゆっくりと注ぐ。生成した沈殿を濾過し、1000mlのアセトン/水(5:1)で2回および1000mlのアセトンで3回洗浄し、最後に30°で24時間真空乾燥する。4.5gの標記部分デオキシフルトコステロンエステル化合物が得られる。Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>の水性アルコール溶液で種やかにアルカリ加水分解し、クロロホルムで抽出後、ブリティッシュ・ファーマコペイア(British Pharmacopoeia, 1980年, 137頁)にしたがいデオキシフルトコステロンの定量測定を行なう。

#### 実施例14

ヒアルロン酸(HY)の(混合)エタノールおよびカルチゾンエステル(C<sub>21</sub>) (エタノールによりエ

-100-

ステル化されたカルボキシ基80%-カルチゾン(C<sub>21</sub>)によりエステル化されたカルボキシ基20%)の製造。

10ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量70000のHYテトラブチルアンモニウム塩6.2gを25°で310mlのジメチルスルホキシドに溶解し、1.25g(8ミリ当量)のエチルオロジドを加え、生成した溶液を12時間30°に保つ。

0.85g(2ミリ当量)の21-プロモ-4-ブレンゲン-17-α-オール-3,11,20-トリオンを加え、溶液を24時間30°に保つ。

次いで100mlの水および5gの塩化ナトリウムを含む溶液を加え、生成した混合物を2000mlのアセトンに絶えず攪拌しながらゆっくりと注ぐ。生成した沈殿を次いで濾過し、1000mlのアセトン/水(5:1)で3回および1000mlのアセトンで3回洗浄し、最後に30°で8時間真空乾燥する。

4.6gの標記混合エタノールおよびカルチゾンエステル化合物が得られる。Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>の水性ア

-101-

-30-

-102-

ルコール溶液で穏やかにアルカリ加水分解し、クロロホルムで抽出後、ブリティッシュ・ファーマコペイア(British Pharmacopoeia, 1980年)にしたがいコルチゾンの定量測定を行なう。

エトキシルの定量測定はクンディフおよびマルクナスの方法〔アナリティカル・ケミストリー(Anal. Chem.) 33巻、1028-1030頁(1961年)]にしたがい行なわれる。

#### 実施例15

ヒアルロン酸(HY)の(混合)エタノールおよびヒドロコルチゾンエステル(C<sub>21</sub>)(エタノールによりエステル化されたカルボキシル基80%-ヒドロコルチゾン(C<sub>21</sub>)によりエステル化されたカルボキシル基20%)の製造。

10ミリ当量のモノマー単位に対応する分子重125000のHYテトラブチルアンモニウム塩6.2gを25°で310mlのジメチルスルホキシドに溶解し、1.25g(8ミリ当量)のエチルヨードを加え、溶液を30°で12時間保つ。

0.85g(2ミリ当量)の21-ブプロモ-4-ブ

レグネン-11β,17α-ジオール-3,20-ジオンを加え、溶液を24時間30°に保つ。

次いで100mlの水および5gの塩化ナトリウムを含む溶液を加え、生成した混合物を2000mlのアセトンに絶えず攪拌しながらゆっくりと注ぐ。生成した沈殿を濾過し、100mlのアセトン/水(5:1)で3回および100mlのアセトンで3回洗浄し、最後に8時間30°で真空乾燥する。

4.6gの標記混合エタノールおよびヒドロコルチゾンエステルが得られる。Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>の水性アルコール溶液で穏やかにアルカリ加水分解し、クロロホルムで抽出後、ブリティッシュ・ファーマコペイア(British Pharmacopoeia, 1980年)にしたがいヒドロコルチゾンの定量測定を行なう。

エトキシルの定量測定はクンディフおよびマルクナスの方法〔アナリティカル・ケミストリー(Anal. Chem.) 33巻、1028-1030頁(1961年)]にしたがい行なわれる。

#### 実施例16

-103-

ヒアルロン酸(HY)の(混合)エタノールおよびフルオロコルチゾンエステル(C<sub>21</sub>)(エタノールによりエステル化されたカルボキシル基80%-フルオロコルチゾン(C<sub>21</sub>)によりエステル化されたカルボキシル基20%)の製造。

10ミリ当量のモノマー単位に対応する分子重70000のHYテトラブチルアンモニウム塩6.2gを25°で310mlのジメチルスルホキシドに溶解し、1.25g(8ミリ当量)のエチルヨードを加え、溶液を24時間30°に保つ。

0.89g(2ミリ当量)の9α-フルオロ-21-ブプロモ-4-ブレグネン-11β,17α-ジオール-3,20-ジオンを加え、溶液を24時間30°に保つ。

次いで100mlの水および5gの塩化ナトリウムを含む溶液を加え、生成した混合物を2000mlのアセトンに絶えず攪拌しながらゆっくりと加える。沈殿が形成され、これを濾過し、100mlのアセトン/水(5:1)で3回および100mlのアセトンで3回洗浄し、最後に8時間30°で真

-104-

空乾燥する。

4.6gの標記混合エタノールおよびフルオロコルチゾンエステル化合物が得られる。Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>の水性アルコール溶液で穏やかにアルカリ加水分解し、クロロホルムで抽出後、ブリティッシュ・ファーマコペイア(British Pharmacopoeia, 1980年)にしたがいフルオロコルチゾンの定量測定を行なう。

エトキシルの定量測定は、クンディフおよびマルクナスの方法〔アナリティカル・ケミストリー(Anal. Chem.) 33巻、1028-1030頁(1961年)]にしたがい行なわれる。

#### 実施例17

ヒアルロン酸(HY)の(混合)エタノールおよびデオキシコルチコステロンエステル(C<sub>21</sub>)(エタノールによりエステル化されたカルボキシル基80%-デオキシコルチコステロン(C<sub>21</sub>)によりエステル化されたカルボキシル基20%)の製造。

10ミリ当量のモノマー単位に対応する分子重70000のHYテトラブチルアンモニウム塩6.

2gを25°で310mlのジメチルスルホキシドに溶解し、1.25g(8ミリ当量)のエチルヨードを加え、生成した溶液を12時間30°に保つ。

0.661g(2ミリ当量)の2-ブプロモ-4-レグネン-3,20-ジオンを加え、溶液を24時間30°に保つ。

次いで100mlの水および5gの塩化ナトリウムを含む溶液を加え、生成した混合物を2000mlのアセトンに絶えず攪拌しながらゆっくり注ぐ。沈殿が形成され、これを濾過し、100mlのアセトン/水(5:1)で3回および100mlのアセトンで3回洗浄し、最後に30°で8時間真空乾燥する。

4.6gの標記混合エタノールおよびデオキシコルチコステロンエステル化合物が得られる。Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>の水性アルコール溶液で穏やかにアルカリ加水分解し、クロロホルムで抽出後、ブリティッシュ・ファーマコペイア(British Pharmacopoeia, 1980年)にしたがいデオキシコルチコステロンの定量測定が行なわれる。

-107-

ムを含む溶液を加え、生成した混合物を2000mlのアセトンに絶えず攪拌しながらゆっくり注ぐ。沈殿が形成されるが、これを濾過し、100mlのアセトン/水(5:1)で3回および100mlのアセトンで3回洗浄し、最後に30°で8時間真空乾燥する。

4.5gの標記部分および混合エタノールおよびデオキシコルチコステロンエステル化合物が得られる。Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>の水性アルコール溶液で穏やかにアルカリ加水分解し、クロロホルムで抽出後、ブリティッシュ・ファーマコペイア(British Pharmacopoeia, 1980年)にしたがいデオキシコルチコステロンの定量測定を行なう。

エトキシルの定量測定はクンディフおよびマルクナス(アナリティカル・ケミストリー(Anal. Chem.)33巻、1028-1030頁(1961年))にしたがい行なう。

#### 実施例19

ヒアルロン酸(HY)の(部分および混合)エタノールおよびコルチゾンエステル(エタノールによ

エトキシルの定量測定はクンディフおよびマルクナス(アナリティカル・ケミストリー(Anal. Chem.)33巻、1028-1030頁(1961年))にしたがい行なわれる。

#### 実施例18

ヒアルロン酸(HY)の(部分および混合)エタノールおよびデオキシコルチコステロンエステル(エタノールによりエステル化されたカルボキシル基40%-デオキシコルチコステロン(C<sub>21</sub>)によりエステル化されたカルボキシル基20%-(Na)塩にされたカルボキシル基40%)の製造。

10ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量125000のHYテトラブチルアンモニウム塩6.2gを25°で310mlのジメチルスルホキシドに溶解し、0.62g(4ミリ当量)のエチルヨードを加え、溶液を24時間30°に保つ。

0.85g(2ミリ当量)の2-ブプロモ-4-レグネン-3,20-ジオンを加え、溶液を24時間30°に保つ。

次いで100mlの水および5gの塩化ナトリウ

-108-

りエステル化されたカルボキシル基40%-コルチゾン(C<sub>21</sub>)によりエステル化されたカルボキシル基20%-(Na)塩にされたカルボキシル基40%)の製造。

10ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量125000のHYテトラブチルアンモニウム塩6.2gを25°で310mlのジメチルスルホキシドに溶解し、0.62g(4ミリ当量)のヨウ化エチルを加え、溶液を24時間30°に保つ。

0.85g(2ミリ当量)の2-ブプロモ-4-レグネン-17α-オール-3,11,20-トリオンを加え、溶液を24時間30°に保つ。

次いで100mlの水および5gの塩化ナトリウムを含む溶液を加え、生成した混合物を2000mlのアセトンに絶えず攪拌しながらゆっくり注ぐ。沈殿が形成されるが、これを濾過し、100mlのアセトン/水(5:1)で3回および100mlのアセトンで3回洗浄し、最後に30°で8時間真空乾燥する。

4.5gの標記部分および混合エタノールおよび

-109-

-32-

-110-

コルチゾン化合物が得られる。 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ の水性アルコール溶液で穏やかにアルカリ加水分解し、クロロホルムで抽出後、ブリティッシュ・ファーマコペイア(British Pharmacopoeia, 1980年)にしたがいコルチゾンの定量測定を行なう。

エトキシルの定量測定についてはクンディフおよびマルクナスの方法〔アナリティカル・ケミストリー(Anal.Chem.)33巻、1028-1030頁(1961年)〕にしたが行なう。

#### 実施例20

ヒアルロン酸(HY)の(部分および混合)エタノールおよびヒドロコルチゾンエステル( $\text{C}_{11}$ )(エタノールによりエステル化されたカルボキシ基40%-ヒドロコルチゾン( $\text{C}_{11}$ )によりエステル化されたカルボキシ基20%-(Na)塩にされたカルボキシ基40%)の製造。

10ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量70000のHYテトラブチルアンモニウム塩6.2gを25°で310mgのジメチルスルホキシドに溶解し、0.62g(4ミリ当量)のヨウ化エチル

-111-

ー(Anal.Chem.)33巻、1028-1030頁(1961年)〕にしたが行なう。

#### 実施例21

ヒアルロン酸の(部分および混合)エタノールおよびフルオロコルチゾンエステル( $\text{C}_{11}$ )の製造(エタノールによりエステル化されたカルボキシ基40%-フルオロコルチゾン( $\text{C}_{11}$ )によりエステル化されたカルボキシ基20%-(Na)塩にされたカルボキシ基40%)。

10ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量65000のHYテトラブチルアンモニウム塩6.2gを25°で310mgのジメチルスルホキシドに溶解し、0.62g(4ミリ当量)のヨウ化エチルを加え、溶液を24時間30°に保つ。

0.89g(2ミリ当量)の9 $\alpha$ -フルオロ-21-プロモ-4-プレグネン-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -ジオール-3,20-ジオンを加え、溶液を24時間30°に保つ。

次いで100mgの水および5gの塩化ナトリウムを含む溶液を加え、生成した混合物を2000

を加え、溶液を24時間30°に保つ。

0.85g(2ミリ当量)の21-プロモ-4-プレグネン-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -ジオール-3,20-ジオンを加え、溶液を24時間30°に保つ。

次いで100mgの水および5gの塩化ナトリウムを含む溶液を加え、生成した混合物を2000mgのアセトンに絶えず攪拌しながらゆっくりと注ぐ。沈殿が形成され、これを濾過し、100mgのアセトン/水(5:1)で3回および100mgのアセトンで3回洗浄し、最後に30°で8時間真空乾燥する。

4.5gの標記部分および混合エタノールおよびヒドロコルチゾンエステル化合物が得られる。 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ の水性アルコール溶液で穏やかにアルカリ加水分解し、クロロホルムで抽出後、ブリティッシュ・ファーマコペイア(British Pharmacopoeia, 1980年)にしたがいヒドロコルチゾンの定量測定を行なう。

エトキシルの定量測定については、クンディフおよびマルクナス(アナリティカル・ケミストリ

-112-

mgのアセトンに絶えず攪拌しながらゆっくりと注ぐ。沈殿が形成され、これを濾過し、100mgのアセトン/水(5:1)で3回および100mgのアセトンで3回洗浄し、最後に30°で8時間真空乾燥する。

4.6gの標記部分および混合エタノールおよびフルオロコルチゾンエステル化合物が得られる。 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ の水性アルコール溶液で穏やかにアルカリ加水分解し、クロロホルムで抽出後、ブリティッシュ・ファーマコペイア(British Pharmacopoeia, 1980年)にしたがいフルオロコルチゾンの定量測定を行なう。

エトキシルの定量測定については、クンディフおよびマルクナスの方法〔アナリティカル・ケミストリー(Anal.Chem.)33巻、1028-1030頁(1961年)〕にしたが行なう。

#### 実施例22

ヒアルロン酸(HY)のn-ベンチルエステルの製造。

20ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量

-113-

-114-

620000のHYテトラブチルアンモニウム塩12.4gを25°で620mlのジメチルスルホキシドに溶解し、3.8g(25ミリ当量)のn-ペンチルブロミドおよび0.2gのテトラブチルアンモニウムヨードを加え、溶液を12時間30°に保つ。

生成した混合物を3500mlの酢酸エチルに絶えず振盪しながらゆっくりと注ぐ。沈殿が形成され、これを濾過し、500mlの酢酸エチルで4回洗浄し、最後に24時間30°で真空乾燥する。

8.7gの標記n-ペンチルエステル生成物が得られる。エステル基の定量測定を、シグマおよびハンナ「クオンティタイプ・オーガニック・アナリシス・ピア・ファンクショナル・グループス」(Quantitative organic analysis via functional groups, 第4版ジョン・ウィリー・アンド・ソンス)169-172頁記載の方法を用いて行なう。

#### 実施例23

ヒアルロン酸(HY)のイソペンチルエステルの

-115-

ヒアルロン酸(HY)ベンジルエステルの製造。

20ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量170000のHYテトラブチルアンモニウム塩12.4gを25°で620mlのジメチルスルホキシドに溶解し、4.5g(25ミリ当量)の臭化ベンジルおよび0.2gのテトラブチルアンモニウムヨードを加え、溶液を12時間30°に保つ。

生成した混合物を3500mlの酢酸エチルに絶えず振盪しながらゆっくりと注ぐ。沈殿が生成し、これを濾過し、500mlの酢酸エチルで4回洗浄し、最後に24時間30°で真空乾燥する。

9.9gの標記ベンジルエステル生成物が得られる。エステル基の定量測定をシグマおよびハンナ「クオンティタイプ・オーガニック・アナリシス・ピア・ファンクショナル・グループス」(Quantitative organic analysis via functional groups, 第4版ジョン・ウィリー・アンド・ソンス)169-172頁記載の方法にしたが行なう。

#### 実施例25

製造。

20ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量170000のHYテトラブチルアンモニウム塩12.4gを25°で620mlのジメチルスルホキシドに溶解し、3.8g(25ミリ当量)の臭化イソペンチルおよび0.2gのテトラブチルアンモニウムヨードを加え、溶液を12時間30°に保つ。

生成した混合物を3500mlのアセトンに絶えず振盪しながらゆっくりと加える。沈殿が形成され、これを濾過し、500mlの酢酸エチルで4回洗浄し、最後に24時間30°で真空乾燥する。

8.6gの標記イソペンチルエステル生成物が得られる。エステル基の定量測定を、シグマおよびハンナ「クオンティタイプ・オーガニック・アナリシス・ピア・ファンクショナル・グループス」(Quantitative organic analysis via functional groups, 第4版ジョン・ウィリー・アンド・ソンス)169-172頁記載の方法にしたが行なう。

#### 実施例24

-116-

ヒアルロン酸(HY)のβ-フェニルエチルエステルの製造。

20ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量125000のHYテトラブチルアンモニウム塩12.4gを25°で620mlのジメチルスルホキシドに溶解し、4.6g(25ミリ当量)の2-ブロモエチルベンゼンおよび185mgのテトラブチルアンモニウムヨードを加え、溶液を12時間30°に保つ。

生成した混合物を3500mlの酢酸エチルに絶えず振盪しながらゆっくりと注ぐ。こうして生成した沈殿を次に濾過し、500mlの酢酸エチルで4回洗浄し、最後に30°で24時間真空乾燥する。

9.1gの標記β-フェニルエチルエステル生成物が得られる。エステル基の定量測定を、シグマおよびハンナ「クオンティタイプ・オーガニック・アナリシス・ピア・ファンクショナル・グループス」(Quantitative organic analysis via functional groups, 第4版ジョン・ウィリー

・アンド・ソンス)168-172頁記載の方法にしたがい行なう。

#### 実施例26

ヒアルロン酸(HY)ベンジルエステルの製造。  
分子番162000のHYカリウム塩3gを200mlのジメチルスルホキシドにけん濁する。120mgのテトラブチルアンモニウムヨードおよび2.4gの臭化ベンジルを加える。

けん濁液を30°で48時間攪混し続ける。生成した混合物を1000mlの酢酸エチルに絶えず攪混しながらゆっくりと注ぐ。こうして生成した沈殿を濾過し、150mlの酢酸エチルで4回洗浄し、最後に30°で24時間真空乾燥する。

3.1gの標記ベンジルエステル生成物が得られる。エステル基の定量測定は、シグマおよびハルナ、「クオンティクティブ・オーガニック・アナリシス・ピア・ファンクショナル・グループス」(Quantitative organic analysis via functional groups, 第4版ジョン・ウィリー・アンド・ソンス)169-172頁記載の方法に

-119-

ラムで溶出する。

ナトリウムを含まない溶出液をストレプトマイシン塩基溶液に攪混しながら集める。生成した溶液を直ちに冷凍し、凍結乾燥する。収量1.7g。

ストレプトマイシン標準塩と比較したパルス・サブテリス(B. subtilis)ATCC6633に関する微生物学的測定ではストレプトマイシン塩基の10.9重量%の含有量を示しており、これは理論的に計算された含有量に一致する。

#### 実施例28

エタノールにより部分的にエステル化されたヒアルロン酸(HY)のエリスロマイシン塩の製造(エタノールでエステル化されたカルボキシル基75%-エリスロマイシン塩にされたカルボキシル基25%)

HYのエチルエステル75%およびナトリウム塩25%からなるもの1.6g(非エステル化カルボキシル基に関して1ミリ当量のモノマー単位に対応する)を400mlの水に溶解する。この溶液を20°でH<sup>+</sup>形スルホン酸樹脂(ダウエックス(

Dowex)1×8)168-172頁記載の方法にしたがい行なわれる。

#### 実施例27

エタノールにより部分的にエステル化されたヒアルロン酸(HY)のストレプトマイシン塩の製造(エタノールでエステル化されたカルボキシル基75%-ストレプトマイシンにより塩にされたカルボキシル基25%)

243mgの硫酸ストレプトマイシン(1ミリ当量)を20mlの水に溶解する。溶液を5°で2mlのOH<sup>-</sup>形第4級アンモニウム樹脂(ダウエックス(Dowex)1×8)を含むサーモスタットカラムで溶出する。

硫酸塩を含まない溶出液を5°の温度でサーモスタット容器に集める。

75%がHYエチルエステルおよび25%がナトリウム塩からなるもの1.6g(非エステル化カルボキシル基について1ミリ当量のモノマー単位に対応する)を400mlの水に溶解する。溶液を20°でH<sup>+</sup>形のスルホン酸樹脂(ダウエックス(Dowex)50×8)2mlを含むサーモスタットカ

-120-

Dowex)50×8)2mlを含むサーモスタットカラムで溶出する。

ナトリウムを含まない溶出液に734mgのエリスロマイシン塩基(1ミリ当量)を加える。生成した溶液を直ちに冷凍し、凍結乾燥する。

収量2.1g。

標準のエリスロマイシンと比較した Stafylococcus aureus (S. aureus) ATCC 6538 に関する微生物学的測定では、エリスロマイシンの31.7重量%の含有量を示し、これは理論的に計算された重量に一致している。

#### 実施例29

エタノールにより部分的にエステル化されたヒアルロン酸(HY)ネオマイシン塩の製造(エタノールでエステル化されたカルボキシル基75%-ネオマイシン塩にされたカルボキシル基25%)。

152mgの硫酸ネオマイシン(1ミリ当量)を10mgの水に溶解する。溶液を5°でOH<sup>-</sup>形第4級アンモニウム樹脂(ダウエックス(Dowex)1×8)2mlを含むサーモスタットカラムで溶出する。

-121-

-122-

硫酸塩を含まない溶出液を5°の温度でサーモスタット容器に集める。

H Yのエチルエステル75%およびナトリウム塩25%からなるもの1.6g(非エステル化カルボキシルに関して1ミリ当量のモノマー単位に対応する)を400mlの水に溶解する。溶液を20°でH<sup>+</sup>形スルホン酸樹脂(ダウエックス(Dowex)50×8)2粒を含むサーモスタットカラムで溶出する。

ナトリウムを含まない溶出液を振盪下ネオマイシン塩基溶液に集める。生成した溶液を直ちに冷凍し、凍結乾燥する。収量1.65g。

標準ネオマイシン酸と比較したスタフィロコッカス・アウレウス(*S. aureus*)ATCC 6538に関して行なわれた微生物学的測定ではネオマイシン塩基の6.1重量%の含有量を示すが、これは理論的計算値と一致する。

#### 実施例30

エタノールにより部分的にエステル化されたヒアルロン酸(H Y)ガンタマイシン塩の製造(エタ

ノールによりエステル化されたカルボキシル基75%-ガンタマイシン塩にされたカルボキシル基25%)。

145mgの硫酸ガンタマイシンを10mlの水に溶解する。溶液を5°でOH<sup>-</sup>形第四級ウミノウム樹脂[ダウエックス(Dowex)1×8]2粒を含むサーモスタットカラムで溶出する。

硫酸塩を含まない溶出液を5°の温度でサーモスタット容器に集める。

H Yエチルエステル75%およびナトリウム塩25%からなるもの1.6g(非エステル化カルボキシルに関して1ミリ当量のモノマー単位に対応)を400mlの水に溶解する。溶液を20°で2粒のH<sup>+</sup>形スルホン酸樹脂(ダウエックス(Dowex)50×8)を含むサーモスタットカラムで溶出する。

ナトリウムを含まない溶出液を振盪しながらガンタマイシン塩基溶液に集める。生成した溶液を直ちに冷凍し、凍結乾燥する。収量1.7g。

標準ガンタマイシンと比較したスタフィロコ

-123-

カス・エピデルミディス(*S. epidermidis*)ATCC 12228について行なわれた微生物学的測定では、ガンタマイシン塩基の6.50重量%の含有量を示すが、これは理論的計算値に一致する。

#### 実施例31

エタノールにより部分的にエステル化されたヒアルロン酸(H Y)アミカシン塩の製造(エタノールでエステル化されたカルボキシル基75%-アミカシン塩にされたカルボキシル基25%)。

147mgのアミカシン塩基(1ミリ当量)を20mlの水に溶解する。

H Yエチルエステル75%およびナトリウム塩25%からなるもの1.6g(非エステル化カルボキシルに関して1ミリ当量のモノマー単位に対応する)を400mlの水に溶解する。溶液を20°で2粒のH<sup>+</sup>形スルホン酸樹脂[ダウエックス(Dowex)50×8]を含むサーモスタットカラムで溶出する。

ナトリウムを含まない溶出液を振盪しながらアミカシン塩基溶液に集める。生成した溶液を直

-124-

ちに冷凍し、凍結乾燥する。収量1.70g。

標準アミカシンと比較したスタフィロコッカス・アウレウス(*S. aureus*)ATCC 29737について実施した微生物学的測定では、アミカシン塩基の8.5重量%の含有量を示すが、これは理論的計算値に一致している。

#### 実施例32

エタノールにより部分的にエステル化されたヒアルロン酸(H Y)カナマイシン塩の製造(エタノールによりエステル化されたカルボキシル基75%-カナマイシン塩にされたカルボキシル基25%)。

146mgの硫酸カナマイシン(1ミリ当量)を20mlの水に溶解する。この溶液を5°でOH<sup>-</sup>形第四級アンモニウム樹脂(ダウエックス(Dowex)1×8)2粒を含むサーモスタットカラムで溶出する。

硫酸塩を含まない溶出液を5°の温度でサーモスタット容器に集める。

H Yエチルエステル75%およびナトリウム塩



25%からなるもの1.6g(非エステル化カルボキシルに関して1ミリ当量のモノマー単位に対応する)を400mlの水に溶解する。溶液を20°でH<sup>+</sup>形スルホン酸樹脂〔ダウエックス(Dowex) 50×8〕2mlを含むサーモスタットカラムで溶出する。

ナトリウムを含まない溶出液を濃縮しながらカナマイシン塩基溶液に集める。生成した溶液を直ちに冷凍し、凍結乾燥する。収量1.5g。

標準カナマイシンと比較したバチルス・サブチリス(B. subtilis)ATCC 6633について行った微生物学的測定では、カナマイシン塩基の7重量%の含有量を示すが、これは理論的計算値に一致している。

#### 実施例33

エタノールにより部分的にエステル化されたヒアルロン酸(HY)ピロカルピン塩の製造(エタノールによりエステル化されたカルボキシル基75%—ピロカルピン塩にされたカルボキシル基25%)

-127-

20ミリ当量のモノマー単位に対応する分子量165000のHYテトラブチルアンモニウム塩12.4gを25°で620mlのジメチルスルホキシドに溶解し、2.9g(17ミリ当量)のヨウ化プロピルを加え、生成した溶液を12時間30°に保つ。

次いで62mlの水および9gの塩化ナトリウムを含む溶液を加え、生成した混合物を3500mlのアセトンに絶えず攪拌しながらゆっくりと注ぐ。沈殿が形成され、これを濾過し、500mlのアセトン/水(5:1)で3回およびアセトンで3回洗浄し、最後に30°で8時間真空乾燥する。

次いで生成物を1%の塩化ナトリウム水溶液500mlに溶かし、溶液を3000mlのアセトンに絶えず攪拌しながらゆっくりと注ぐ。沈殿が形成され、これを濾過し、500mlのアセトン/水(5:1)で2回および500mlのアセトンで3回洗浄し、最後に30°で24時間真空乾燥する。8gの標記部分プロピルエステル化合物が得られる。エステル基の定量測定をクンディフおよびマルク

245mgの塩酸ピロカルピン(1ミリ当量)を200mlの水に溶解する。溶液を5°でOH<sup>-</sup>形第四級アンモニウム樹脂〔ダウエックス(Dowex)1×8〕2mlを含むサーモスタットカラムで溶出する。塩化物を含まない溶出液を5°でサーモスタット容器に集める。

HYエステル75%およびナトリウム塩25%からなるもの1.6g(非エステル化カルボキシルに関して1ミリ当量のモノマー単位に対応する)を400mlの水に溶解する。溶液を20°でH<sup>+</sup>形スルホン酸樹脂〔ダウエックス(Dowex) 50×8〕2mlを含むサーモスタットカラムで溶出する。

ナトリウムを含まない溶出液を濃縮しながらピロカルピン塩基溶液に集める。生成した溶液を直ちに冷凍し、凍結乾燥する。収量1.89g。

#### 実施例34

ヒアルロン酸(HY)(部分)プロピルエステルの製造(エステル化されたカルボキシル基85%—Na塩にされたカルボキシル基15%)。

-128-

ナスの方法〔アナリティカル・ケミストリー(Anal. Chem.) 33巻、1028—1030頁(1961年)]を用いて行なう。

#### 実施例35

n-プロパノールにより部分的にエステル化されたヒアルロン酸(HY)ピロカルピン塩の製造(n-プロパノールによりエステル化されたカルボキシル基85%—ピロカルピン塩にされたカルボキシル基15%)。

245mgの塩酸ピロカルピン(1ミリ当量)を100mlの水に溶解する。溶液を5°でOH<sup>-</sup>形第四級アンモニウム樹脂〔ダウエックス(Dowex)1×8〕2mlを含むサーモスタットカラムで溶出する。塩化物を含まない溶出液を5°でサーモスタット容器に集める。

HYプロピルエステル85%およびテトラブチルアンモニウム塩15%からなるもの4.1g(非エステル化カルボキシルに関して1ミリ当量のモノマー単位に相当する)を100mlのジメチルスルホキシドに溶解する。溶液を20°でH<sup>+</sup>形の塩

-129-

-37-

-130-

スルホン酸樹脂 (ダウエックス(Dowex) 50×8) 2 mlを含むサースタットカラムで溶出する。

溶出液を振盪しながらピコラビン塩基溶液に果める。生成した溶液を酢酸エチル(600 ml)により沈殿させる。

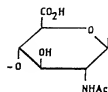
沈殿を濾過し、200 mlの酢酸エチルで4回洗浄し、最後に30°で24時間真空乾燥する。3.5 gの標記化合物が得られる。

#### 実施例 3 6

リノクラディエラ・エリアトル(Rhinocladia ella eliator)により産生された酸性多糖エチルエステルの製造。

リノクラディエラ・エリアトル・マンガノット(Rhinocladia ella eliator Manganosol) NR RL YB-4613により産生された酸性多糖が用いられる(ワトソン、サンドフォード、パートン、カドモスおよびジーネス、「カーボハイドレート・リサーチ」(Carbohydr. Res.) 46巻、259-265頁(1976年)、ケン、リンドバーグ、ピーターソンおよびアンガー、「カーボハ

イドレート・リサーチ」(Carbohydr. Res.) 84巻、184-186頁(1980年))。これは1→4結合により結合された2-アセトアミド-2-デオキシ-D-グルクロン酸単位でできている。



-131-

20ミリ当量のモノマー単位に相当する、5.2 gの上記酸性多糖カリウム塩を250 mlのジメチルスルホキシドにけん固する。混合物の振盪を続けながら、35°で200 mgのテトラブチルアンモニウムヨードを加え、次にゆっくりとメチルヨード3.5 gを加える。混合物の振盪を35°で48時間続けた後、800 mlの酢酸エチルに絶えず振盪しながらゆっくりと注ぐ。沈殿が形成され、これを濾過し、150 mlの酢酸エチルで4回洗浄し、最後に真空乾燥する。こうしてカルボキシル基がすべてエステル化された。標記エチルエステル生成物4 gを得る。エステル基の定量測定はクンディフおよびマルクナスの方法(アナリティカル・ケミストリー(Anal. Chem.) 33巻、1028-1030頁(1961年))により行な

われる。

#### 実施例 3 7

リノクラディエラ・エリアトル(Rhinocladia ella eliator)により産生された酸性多糖エチルエステルの製造。

20ミリ当量のモノマー単位に相当する、実施例36で出発物質として用いられた酸性多糖テトラブチルアンモニウム塩10.0 gを30°で800 mlのジメチルスルホキシドにより処理する。3.3 g(21.2ミリ当量)のヨウ化エチルを加え、溶液の振盪を48時間30°で続ける。絶えず振盪し続けながら生成した混合物を4000 mlの酢酸エチルにゆっくりと注ぐ。沈殿が形成されるが、これを濾過し、500 mlの酢酸エチルで4回洗浄し、最後に真空乾燥する。

3 gの標記エチルエステル生成物を得るが、カルボキシル基はすべてエステル化されている。

エステル基の定量測定はクンディフおよびマルクナスの方法(アナリティカル・ケミストリー(Anal. Chem.) 33巻、1028-1030頁(1961年))により行な

-132-



H Y C 4、H Y C 5 および H Y C 8 (DMSO に溶解)以外のすべての誘導体は塩水に溶けた2 mg/ml。

#### 方法

48羽のうさぎにデキストランを眼内注射(塩水中1%, 0.1 ml)することにより無菌性(滲出性)炎症を誘発した。うさぎの右眼(RB)には様々な薬剤を滴下投与し、左眼(LB)には賦形剤のみを滴下した。

デキストランを注射後直ちに処置(6時間毎に3滴)を開始し、16日間続けた。

#### 眼の検査法

各うさぎの両眼を細眼灯により観察した。特に結膜および角膜上皮の状態、前眼房(タンブル現象の存在)、虹彩および眼後部の状態を検査した。ゴールドマンレンズを用いて眼の後の状態を検査した。炎症徴候(充血、滲出物、眼液のくもり等)の存在が記録された。次いで炎症の徴候が存在しない眼のパーセンテージを計算した。

#### 結果

-139-

第2表

うさぎの眼におけるデキストラン誘発性無菌性(滲出性)炎症に対するH Y C誘導体(ヒアルロン酸エステル)の抗炎症作用

処 置	炎症の始まりからの日数							
	2	4	6	8	10	12	14	16
コルチゾン(4)	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	50.0	100.0	100.0
賦形剤(4)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	25.0	50.0
ヒドロコルチゾン(4)	0.0	0.0	0.0	25.0	25.0	50.0	100.0	100.0
賦形剤(4)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	50.0	100.0
フルオロコルチゾン(4)	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	50.0	100.0	100.0
賦形剤(4)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	50.0	50.0	100.0
H Y C 1 (4)	0.0	0.0	0.0	25.0	50.0	50.0	100.0	100.0
賦形剤(4)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	50.0	100.0
H Y C 2 (4)	0.0	0.0	0.0	25.0	50.0	100.0	100.0	100.0
賦形剤(4)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	50.0	100.0
H Y C 3 (4)	0.0	0.0	0.0	25.0	25.0	100.0	100.0	100.0
賦形剤(4)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	50.0	100.0
H Y C 4 (4)	0.0	0.0	25.0	50.0	50.0	100.0	100.0	100.0
賦形剤(4)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	50.0	100.0
H Y C 5 (4)	0.0	0.0	25.0	50.0	50.0	100.0	100.0	100.0
賦形剤(4)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	50.0	100.0
H Y C 6 (4)	0.0	0.0	25.0	50.0	50.0	100.0	100.0	100.0
賦形剤(4)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	25.0	50.0
H Y C 7 (4)	0.0	0.0	0.0	25.0	50.0	100.0	100.0	100.0
賦形剤(4)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	50.0	50.0
H Y C 8 (4)	0.0	0.0	0.0	25.0	50.0	100.0	100.0	100.0
賦形剤(4)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	50.0	50.0	50.0
H Y C 9 (4)	0.0	0.0	0.0	25.0	25.0	50.0	100.0	100.0
賦形剤(4)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	50.0	50.0	100.0

第2表の記録結果からわかるように、H Y C誘導体はすべて、平行して試験された対応するコルチゾンの場合よりも一貫して著しい抗炎症活性を有し、観察日毎の炎症を患う眼のパーセンテージを減少させるだけでなく、炎症期間を減らすことがわかった。これらの誘導体のうち最も効果的なものはH Y C 4、H Y C 5 および H Y C 6 であると思われるが、これらの脂溶性と強いのが原因であると考えられる。

-140-

数値をパーセンテージで表わす(処置された眼の合計数中の炎症徴候が認められない眼の数)。括弧内は処置された眼の数である。

#### 2) 吸収および生物学的利用能の研究

ヒドロコルチゾンとヒアルロン酸からなるいくつかの誘導体の吸収性および生物学的利用能を研究することによりこの発明による新規生成物の実用上の効果が立証され得る。使用された誘導体は前述のH Y C 2、H Y C 5 および H Y C 8 と命名されたものである。

#### 材料および方法

##### 動物

チャールズ・リバー・カルコ(コム)から入手した、体重250-350グラムの雄のスプラインード・ラットを用い、水およびコード名4 R P 21のペレット状化合物飼料(「イタリナ・マングローブ」製、チャールズ・リバー認可)を無制限に与えた。

##### 処置

ヘミコはク酸ナトリウム塩形のヒドロコルチゾン

ンを、一般的な静脈経路により  $1.34 \text{ mg/kg}$  ( $1 \text{ mg/kg}$  のヒドロコルチゾン塩基に相当) の用量並びに皮下経路により  $1.34 \text{ mg/kg}$  および  $2.68 \text{ mg/kg}$  ( $2 \text{ mg/kg}$  のヒドロコルチゾン塩基に相当) の用量で投与した(静脈経路は吸収度に関する他の投与経路との比較に役立つ薬物動力学のパラメーターを測定するために採用された)。

3種のH Y C誘導体を、6.5および  $13 \text{ mg/kg}$  の用量(約1および  $2 \text{ mg/kg}$  のヒドロコルチゾン塩基に対応する用量)で皮下経路により投与した。種々の生成物すべてを滅菌塩水に溶かすが、但し水性溶液に完全に不溶性のH Y C 5については最少必要量のジメチルスルホキシドを加えて可溶化し、次いで塩水を加えて正確な容量にした。すべての化合物を  $1 \text{ mg/kg}$  の一定容量で注射した。

#### 血漿試料の採取

投与後、抗凝血漿(ヘパリンナトリウム)の存在下心臓穿刺により各動物から  $0.3 \text{ ml}$  の血液を取り出した。

血液を取り出す時間は次のとおりであった。す

なわち 15分間、30分間、60分間、120分間、180分間、300分間、360分間、420分間、480分間(※静脈経路に限定)。

#### ヒドロコルチゾンの投薬測定

底砂量のヨウ素酸塩を用いたラジオイムノアッセイ法(コルチゾロキット(Cortisol Kit)、バイオデータ、コード10394)によりヒドロコルチゾンを測定した。この方法の精度および正確さを公知対照アッセイにより対照血清を6回繰り返し(二重)測定すると、それぞれ  $3.03\%$  および  $0.021\%$  であることがわかった。この方法の一次直線は  $1$  ないし  $1000 \text{ ng/ml}$  の間にくる。検出限界は  $1 \text{ ng/ml}$  である。

ラットにおける血液中のコルチゾル(cortisol)の用量はこのホルモンの基底濃度または概日リズムにより影響されることはない。これは、ラットにおける内生グルココルチコイドホルモンの代謝パターンがコルチゾルではなくコルチコステロンの生成をもたらすからである(グリーン、「バイオロジー・オブ・ザ・ラボラトリー・マウス」

-143-

(Biology of the laboratory mouse)参照)。

予備試験により、この投薬法は遊離コルチゾルに対してのみ特異的であることがわかった。抗コルチゾル抗体は3種のH Y C誘導体のいずれに対しても競合形態を呈することはない。

#### 結果

第3表に静脈注射および皮下注射(1および  $2 \text{ mg/kg}$ )後のヒドロコルチゾンの平均血漿濃度の結果を記録する。強調すべきことは、皮下注射後に生成物の非常に速い吸収が行なわれるということである( $T_{max}$ は約30分間で測定され、 $C_{max}$ は同じ用量の静脈内経路の場合の濃度と同じである)。第4表には血漿下降曲線のグラフから計算されたコルチゾルの薬物動力学パラメーターが記録されている。第3表には、3種のH Y C誘導体を6.5および  $13 \text{ mg/kg}$  の用量(約1および  $2 \text{ mg/kg}$  のヒドロコルチゾン塩基に対応する)で皮下投与した後のコルチゾルの平均濃度が記録されている。第4表には3種のH Y C生成物の血漿吸収曲線のグラフから斜率法により計算されたコル

-144-

チゾルに関する薬物動力学パラメーターが記録されている。

留意すべきことは、ヒアルロン酸の3種の誘導体により放出されたヒドロコルチゾンの動態は線形ではないことである。すなわち、血漿下降曲線下部領域のような用量-依存パラメーターと血漿濃度の間には直接的関係は存在しない。コルチゾルの動態自体は線形であり、初めの速度モデルの結果から、H Y C誘導体の場合の飽和プロセスはヒアルロン酸およびコルチゾル間のエステル結合の加水分解であることが推測される。この相(速度ゼロの方向へ傾く動態)自体は活性本質の吸収に結びつくものではないため、3種のH Y Cの動態は初めの速度モデルにより同様に説明された。



はなく皮膚自体から水分を吸収するためかえて皮膚を以前よりも乾燥させてしまうという不利な状況になった。

そのため現在その特質ゆえに前述の天然水和フクターに由来する生物学的物質が好ましいとされている。このような事情でヒアルロン酸の使用に対する著しい関心が集まっている。

皮膚の水和および滋養は皮膚組織のHY含有量と密接な関係にあると思われる。事実HYを外部から与えると皮膚組織の水和状態に著しく貢献することがわかった。

ヒアルロン酸のこれらの特性はまた、この発明によるHYのエステル化誘導体においてもさらに強度に見い出されるため、これらは化粧品分野で広範囲にわたって使用され得る。

ヒアルロン酸およびこの発明の誘導体の比較立証をするため、局所適用後いくつかの実験を行なった試験化合物の水和特性を器械的に測定した。

#### 材料

この発明によるヒアルロン酸誘導体として下記

-151-

パラオキシ安息香酸プロピル、0.0500グラム、  
無水酢酸ナトリウム、0.1000グラム、  
グリセリンF.U.、1.0000グラム、  
ソルビトール(Sorbitol)70、1.5000グラ

ム、

テストクリーム、0.0500グラム、  
注射剤用用水、適量加えて100.0000グラムとする。

ブラセゴ製剤は賦形剤のみ含有。

#### 方法

##### 研究試料

20ないし60歳の10名の健康なボランティア(いかなる種類の皮膚病にもかかっていない6名の女性および4名の男性)において研究を行なった。

#### 処置

各ボランティアの各前腕の内側表面に全部の試験製剤を適用(1グラム/軟膏)し、皮膚温度計鉛筆により各生成物の適用領域(約2.5cm<sup>2</sup>)を区別し、可能な限りこの手順を標準化するという処置

エステルを用いた。

HYAFF<sub>2</sub>、メタノールにより75%エステル化されたヒアルロン酸、

HYAFF<sub>9</sub>、エタノールにより75%エステル化されたヒアルロン酸、

HYAFF<sub>8</sub>、イソプロパノールにより50%エステル化されたヒアルロン酸、

HYAFF<sub>2</sub>、n-プロパノールにより50%エステル化されたヒアルロン酸、

HYAFF<sub>10</sub>、n-ブタノールにより50%エステル化されたヒアルロン酸

ヒアルロン酸ナトリウム塩(ヒアスチンフラクション)。

すべての化合物に賦形剤を加えて下記組織の軟膏中0.2%の濃度とした。

ポリエチレングリコールモノステアレート400、10.0000グラム、

セチオール(Cetiol)V、5.0000グラム、

ラネット(Lanette)SX、2.0000グラム、

パラオキシ安息香酸メチル、0.0750グラム、

-152-

(単一投与)を行なった。右前腕にはHYAFF<sub>2</sub>、HYAFF<sub>9</sub>、HYAFF<sub>8</sub>、HYAFF<sub>2</sub>と命名された化合物を適用し、左前腕にはHYAFF<sub>10</sub>、ブラセゴおよびヒアルロン酸を適用した。

#### 評価パラメータ

一定時間(処置後0、3、6および24時間目)毎に各適用領域の角質層の角質計(corasometer)により水湿度を測定した。

さらに具体的には、皮膚表面にセンサー(コンデンサー)適用後、水の絶縁耐力を(0.8秒で)測定した。こうして得られた値、すなわち0.07mgの水に対応する測定単位(通常の値は90ないし100単位である)を器具のゲイアルから読み取った。

一定湿度状態で記録を行なった。

#### 結果

第5表の結果からわかるように、一連のHYAFF化合物で処置した場合とは違って、適用直後の時間だけでなく最後の記録時にも特に明らかに角質層の水湿度の顕著な増加がもたらされた。この

-153-

-154-

効果はアラセボ製剤の場合およびヒアルロン酸ナトリウム塩含有製剤の場合よりも優れていることがわかった。試験された化合物の中で誘導体HYAFF<sub>10</sub>およびHYAFF<sub>11</sub>が特に興味深いと思われた。

#### 結論

得られた結果に基づき結論できることは、エステル化されたHYAFF誘導体が事実上皮膚レベルにおいてヒアルロン酸含有製剤について認められる場合にまさる顕著でこれまでより低い水和効果を決定的にもたらし、水脂質膜の完全さおよび生物学的効果を確かなものにするということである。したがってこれらの満足すべき結果は、肌荒れの予防(または処置)、火傷およびやけどの処置並びに皮膚の生物学的滋養および弾力性の維持におけるこれらの化合物の有用性の確実な根拠を形成する。

表 5 表

角質層の水和度に関する一連のHYAFF化合物の効果 (各値は10名の対象の平均値を表す)

生 成 物	$\bar{X}$ $\Delta\%$ 時間目	$\bar{X}$ $\Delta\%$ 時間目	$\bar{X}$ $\Delta\%$ 時間目	$\bar{X}$ $\Delta\%$ 時間目	$\bar{X}$ $\Delta\%$ 時間目
ブチラセ	41.5	28.3	13.4	2.2	
ヒアルロン酸	54.7	37.6	19.7	5.3	
HYAFF <sub>10</sub>	66.6	43.1	24.5	6.1	
HYAFF <sub>11</sub>	93.5	66.7	30.1	11.4	
HYAFF <sub>12</sub>	70.0	51.4	26.2	8.7	
HYAFF <sub>13</sub>	81.0	59.9	29.0	9.6	
HYAFF <sub>14</sub>	68.8	57.0	27.5	8.3	

-155-

#### (4) 酵素安定性および酵素透過性の研究

##### 材料

部分的に既述したようにこの発明による新規エステル類の貴重な特性は、それぞれの分野において既知生成物をしのご実用上の利益をもたらしているが、下記化合物により得られたフィルムの酵素安定性および酵素透過性に関する下記結果からさらにこの特性を明らかにする。

HYAFF<sub>10</sub>、メタノールにより100%エステル化されたヒアルロン酸、

HYAFF<sub>11</sub>、エタノールにより100%エステル化されたヒアルロン酸、

HYAFF<sub>12</sub>、イソプロパノールにより100%エステル化されたヒアルロン酸、

HYAFF<sub>13</sub>、n-プロパノールにより100%エステル化されたヒアルロン酸、

HYAFF<sub>14</sub>、ベンジルアルコールにより100%エステル化されたヒアルロン酸

HYAFF<sub>10</sub>、 $\beta$ -ブエニルエチルアルコールにより100%エステル化されたヒアルロン酸、

HYAFF<sub>11</sub>、イソペンチルアルコールにより100%エステル化されたヒアルロン酸。

フィルムは実施例39記載の方法により製造される。

HYAFFフィルムの酵素に対する安定性

各フィルム(重さ約20mg)をうきぎの血清5mlと一緒にポリエチレンカプセルに入れ、一定温度(37°C)に保った。

評価パラメーターはフィルムの溶解所要時間(単位は時)であった。結果を第6表に示す。

ヒアルロンダーゼに対する安定性

各フィルム(重さ約20mg)を1ml当たり100Uの酵素(マイルズ(Miles)-パッチ8062からの精製ヒアルロンダーゼ、活性342流濁度測定単位/mg)を含むpH5の緩衝液(0.1M酢酸塩、0.15M-NaCl)またはpH7.2の緩衝液

-157-

-158-



(0.1 M 硝酸塩、0.15 M-NaCl)と一緒にポリエチレンカプセルに入れ、一定温度(37℃)に保った。評価パラメーターはフィルムの溶解所要時間(単位は時)であった。結果を第6表に示す。

第6表

血清エステラーゼの存在下(37℃)およびヒアルロンダーゼの存在下(37℃、pH 5およびpH 7.2)における一連のHYAFF誘導体のフィルムの安定性

化合物	安定性 (時間)		
		pH 5	pH 7.2
血清エステラーゼ	ヒアルロンダーゼ		
HYAFF <sub>7</sub>	7.2	120	120
HYAFF <sub>120</sub>	120	168	168
HYAFF <sub>90</sub>	90	150	150
HYAFF <sub>60</sub>	60	140	140
HYAFF <sub>130</sub>	130	180	180
HYAFF <sub>130</sub>	130	175	175

-159-

第7表

HYAFFシリーズのフィルムのO <sub>2</sub> 透過性		化合物							
		O <sub>2</sub> の圧力 (23℃, mmHg)							
		0分	15分	30分	60分	90分	120分	240分	
不透過膜	45	90	90	90	90	90	90	90	90
シラスティック	45	340	406	422	422	422	422	420	
HYAFF <sub>7</sub>	45	226	285	300	348	390	390		
HYAFF <sub>120</sub>	45	250	303	320	371	427	420		
HYAFF <sub>90</sub>	45	241	298	315	330	340	386		
HYAFF <sub>60</sub>	45	260	310	328	350	400	400		
HYAFF <sub>130</sub>	45	215	256	317	337	380	375		
HYAFF <sub>130</sub>	45	249	288	310	352	373	370		

## 医薬製剤

この発明の目的は、1種またはそれ以上の前記ヒアルロン酸エステル類およびその塩類を含む医薬製剤、または前記のように局所適応薬理活性物質を前記エステル類の1種と組み合わせることにより得られる1種またはそれ以上の薬剤を提供することにある。すなわちヒアルロン酸エステルが活性物質の賦形剤としての役割を演じる薬剤で

## HYAFFシリーズのフィルムの酸素透過性

各フィルムを積自体により2区分された容器に入れた。一方の区画(容積1.2cc)には部分脱気した水(23℃で4.5 mmHg、PO<sub>2</sub>)を満たし、他方には時間内で一定した速さ(1泡/秒)を保ちながらO<sub>2</sub>およびCO<sub>2</sub>の気流(それぞれ9.5%および5%)を導入した。系全体を密塞で遮断した。

一定した時間(15、30、60、90、120、240分間)に適当なアリコートの水を取り出し(1.2cc)、インストラメンテーション・ラポラトリーズから入手したガス・システム・アナライザー1302を用いてO<sub>2</sub>の百分値を測定した。飽和圧(550 mmHg)を基準値として前記の実験条件でO<sub>2</sub>気流を吹き込むことにより計算した。

不透過膜およびシラスティック(Silastic)〔ルプティ・カタログ(Lepetit cat.) No. 500-1〕との比較試験を行なった。結果を第7表に示す。

-158-

ある。

ヒアルロン酸本来の用途を目的とした治療上不活性なアルコール類とのエステルおよびアルコール本来の用途を目的とした治療上活性のあるアルコール類とのエステルの両方の場合において活性成分としてヒアルロン酸エステルを含有する医薬製剤は常用賦形剤を含有し、経口、経腸、非経口、皮下、局所または皮内用に用いられ得る。したがってこれらは固体または半固体形態、例えばペースト剤、錠剤、ゼラチンカプセル剤、カプセル剤、坐剤、ゼラチン軟カプセル剤である。非経口および皮下用途の場合、筋肉内もしくは皮内投与を目的とした形態または注入もしくは静脈注射に適した形態を用いることができる。したがって前記用途に好都合で生理的液体と融和し得る浸透性のある、活性化合物の溶液または活性化合物の凍結乾燥粉末に1種またはそれ以上の製薬上許容し得る賦形剤または希釈剤を加えたものをもたらすことができる。局所用途の場合、スプレー製剤、例えば鼻スプレー、局所用クリームまたは軟膏また

-161-

-45-

-162-

は皮内投与用の特製ばんそうこうを用い得る。ヒアルロン酸エステル類は低沸点の有機溶媒に可溶であるため、「スプレー」の製造に特に適している。

この発明の製剤はひとまたは動物に投与され得る。これらは液剤、スプレー、軟膏およびクリームの場合好ましくは0.01%ないし10%の活性成分および固体制剤の場合1%ないし100%、好ましくは5%ないし50%の活性化合物を含有する。投与量は個々の必要性、所望の効果および選択された投与経路により異なる。このような製剤の1日用量は、対応する公知製剤を用いる場合の用量、例えばひとまたは馬における例えば関節炎の治療のように対応する治療におけるヒアルロン酸およびその作用が使用目的である治療活性アルコールの混合物から決定され得る。すなわち、例えばコルチゾンとのヒアルロン酸エステルの用量はステロイドの含有量および公知医薬製剤における通常の用量から導かれ得る。

医薬製剤の一定形態は、ヒアルロン酸エステルおよび1種またはそれ以上の活性物質の組み合

わせを含む前記薬剤であることを特徴とする。またこれらは例えば2成分(1および2)のみを一緒または別々に含有する凍結乾燥粉末のような固体制剤型であり得る。この製剤は特に局所用途に適している。事実これらのは添加薬剤は処置される表面と接触したとき、インビトロで以前から製造されてきた溶液と同じ特性を有する、特定の上皮の性質にしたがって適度に濃縮された液剤を生産するものであり、この発明のもう1つの特に重要な態様を呈する。このような液剤は好ましくは蒸留水または滅菌食塩水を溶媒とし、好ましくはヒアルロン酸エステルまたはその塩類の1種以外の医薬賦形剤は含まない。このような液剤の濃度もまた、2成分をそれぞれ個別に考える場合もまたそれらの混合物もしくは塩の場合も例えば0.01ないし75%のような広い範囲内で変化し得る。特に好ましいのは著しい弾性・粘弾性を有する、例えば10%〜90%の割合で薬剤またはその各々の成分を含有する液剤である。

特に重要なのは、無水物(凍結乾燥粉末)または

-103-

溶液の四形態で水または塩水中濃縮または希釈され、可能ならば添加物または補助物質、例えば消毒剤または緩衝液またはその他の役割を演じる無機塩が加えられ、眼科で用いられるタイプの薬剤である。

この発明の薬剤の中で特に重要なのは、場合により、適用される環境に適した酸性度、すなわち生理学的に耐性のpH値を有するものである。例えば前述の塩基性活性物質とヒアルロン酸エステルの塩におけるpHの調節は好適には塩基性物質自体の塩の多量の量を調節することにより行なわれ得る。すなわち、例えばヒアルロン酸エステルと塩基性物質との塩の酸性度が高過ぎる場合、過剰の遊離酸基を前述の無機塩基、例えばナトリウム、カリウムまたはアンモニウム水和物により中和する。

この発明による塩の製造は、接触溶液、水性溶液または有機溶媒に2成分(1および2)、並びに可能ならば適正量の前記アルカリもしくはアルカリ土類金属またはマグネシウムまたはアルミニ

-104-

ウムの塩基または塩基性塩を溶かし、公知技術により無定形無水物形態の塩を単離することにより自体公知の方法で行なわれ得る。例えばまず2成分(1および2)の水溶液を製造し、適当なイオン交換剤によりそれらの塩の水溶液から成分を遊離させ、低温、例えば0°ないし20°の温度で2つの溶液を混合することができる。こうして得られた塩が容易に水に溶ける場合はそれを凍結乾燥することができ、難溶性の塩の場合は遠心分離、濾過または傾斜により分離し、可能ならば続いて乾燥する。

これらの組み合わせられた薬剤の場合も、用量は活性成分単独で使用された場合に基づくため、熟練者により対応する公知薬剤に適した用量を考慮しながら容易に決定され得る。

この発明による化粧品の場合、ヒアルロン酸エステルおよび塩をこの分野の常用賦形剤と混合するが、例えば医薬製剤に関して既に列挙したものが挙げられる。實用されるのは、ヒアルロン酸エステルまたはその塩の1種が化粧品活性成分であり

-105-

-106-

可能ならばさらに他の化粧品成分、例えばステロイド類、例えばプレグネノロンまたは前記成分の1種を含有する局所用クリーム、軟膏およびローションである。このような製剤においてヒアルロン酸エステルは好ましくは化粧品活性を示さないアルコール、例えば低級脂肪族アルコール、例えば前述したものの1種とのエステルである。これらの効果は例えば遊離ヒアルロン酸またはその塩類の場合のように多種成分の内因性化粧品特性に起因している。

しかしながら化粧品はヒアルロン酸以外の特異的作用を有する物質、例えば消毒物質、サンシールド、防水もしくは再生もしくは防水物質、または臭気物質、特に香料のような物質を主成分とし得る。この場合ヒアルロン酸エステル自体が活性成分であり得、その活性が同じ特性を有するアルコール、例えば高級脂肪族アルコールまたはテルペンアルコール(香水の場合)に由来するかまたは特に関連性のある前記特性を有する物質に対する賦形剤として作用する。

-147-

て例えば焼灼後のような皮膚に重大な損傷が生じた場合の皮膚の補助物質または代用物質として、また外科手術における縫糸として外科で用いられるフィルム、薄いシートまたは縫い糸を得ることができることである。この発明は特に、これらの用途並びにヒアルロン酸エステルまたはその塩の1種を適当な有機溶媒、例えばカルボン酸アミド、特に1個ないし5個の炭素原子を有する脂肪酸のジアルキルアミドで、1個ないし6個の炭素原子を有するアルコール基および特に有機スルホキシド、すなわち最高6個の炭素原子を有するアルコール基を含むジアルキルスルホキシド、例えば特にジメチルスルホキシドまたはジエチルスルホキシドに由来するものおよびさらに非常に重要なことに低沸点のフルオリ化溶媒、例えば特にヘキサフルオロイソプロパノールに溶かした溶液を生成することからなる前記製品の製造方法を包含する。この発明は、このような溶液をシートまたは糸の形に変える際に、初めの溶媒には可溶性でヒアルロン酸エステルには不溶性の別の有機もしくは水性溶

-148-

したがって特に重要なのは前記薬剤と類似した化粧品組成物であるが、ただし医薬活性成分(1)が化粧品要素およびその類縁の塩により置き換えられている。

香水業界で使用されるアルコールを用いた前記エステルの場合、香水成分のゆっくりした、一定の遅延性放出が可能であるため、これらのエステルの使用は化学技術における重要な前進を示すものである。

この発明の重要な適用性は既に述べた衛生および外科用品、それらの製造方法および用途に関するものである。したがってこの発明は既に市販されているものと類似した、ヒアルロン酸を主成分とするが、ただし遊離酸またはその塩の1種の代わりにヒアルロン酸エステルまたはその塩の1種を含有するものすべて、例えばインサートまたは眼用レンズを包含する。

この発明による完全に新規な外科および衛生用品の特徴としては、適当な有機溶媒により再生されたヒアルロン酸エステルから適当な方法を用い

-149-

媒、特に低級脂肪族アルコール、例えばエチルアルコールと接触させることにより(初めの)有機溶媒を除去する(蒸式スピニング)か、または沸点があまり高くない溶媒をヒアルロン酸誘導体の溶液製造に用いる場合はこのような溶媒をガス気流、特に適度に熱した窒素による乾燥条件下で除去する(乾式スピニング)ことを包含する。乾-蒸式スピニングにより優れた結果を得ることも可能である。

ヒアルロン酸エステルにより得られた糸は傷の治療および手術で用いるガーゼの製造に使用される。このようなガーゼを用いると、そこに含まれる酵素により生物体における生物分解性もたらされるという非常な利益が得られる。これらの酵素はエステルをヒアルロン酸および対応するアルコールに分解するため、前記酵素により生物体に既存する化合物に分解することになる。用いられるヒアルロン酸エステルがエチルアルコールのような治療上許容されるアルコールとのエステルである場合、これらの酵素はエステルをヒアルロ

ン酸および対応するアルコール、したがって生物体に既存する化合物およびアルコールのような無害な化合物に分解する。

したがってこれらのガーゼおよびまた前述の糸も前述の滅菌(分解性)によりゆっくりと吸収されるため、手術後生物体内に放置され得る。

前記衛生および手術用品を製造する際に例えば縫合糸の場合のように物理的特性を改善する可塑物質を加えて結び目に対する縫合糸の抵抗力を改善することが可能である。これらの画素物質は、例えば脂肪酸アルカリ金属塩、例えばステアリン酸ナトリウムまたはパルミチン酸ナトリウム、多量の炭素原子を有する有機酸エステル等であり得る。

生物体中に存在するエステラーゼに起因する生物分解性を利用した新規エステル類の別の適用例は、薬剤の皮下挿込み用カプセルまたは例えば皮下もしくは筋肉内経路による注射用マイクロカプセルの製造である。緩慢な放出すなわち「遅延」作用を達成するために皮下用薬剤を適用する場合、

-171-

ような望ましくない副作用をひき起こす。ひとではなく動物の場合には、異なる動物種の多臓器に不適合性は存在しないためヒアルロン酸におけるこの危険性は存在しない。

別の適用は柔組織の欠損を補強し補正するという用途に関するものである。喪失または損傷した柔組織に代わる安全かつ効果的な生体適合物質が長い間要求されてきた。パラフィン、テフロン(Teflon)ペースト、シリコーンおよびポリリン(borine)コラーゲンを含む幾つかのアプロラスチック物質が失われた柔組織の代用に使用されてきた。しかしながら、これらの物質は皮膚における永久的な望ましくない組織変化、埋込み部位からの移動および過剰の炎症反応に関係してきた。したがって、医療において融通性のある生体適合物質は相変わらず必要とされている。ヒアルロン酸エステル類は、症瘡、術後の異常萎縮、化学療法、口唇萎縮および老人性のしわのような柔組織損傷の強化および補正に安全で効果的に用いられ得る。

-172-

これまでシリコーン素材でできたカプセルが最もよく用いられてきたが、カプセルが生物体内で移動しがちであり、これを回収できないという不利な点をまめがれ得なかった。新規ヒアルロン酸エステルを用いることにより明らかにこの危険は消えてしまう。

また非常に重要なことはヒアルロン酸エステルでできたマイクロカプセルを製造することにより前述したことと同じ理由でこれまで制限されてきた用途に関する問題が解決され、注射経路でも「遅延」効果が要求されるように広い適用分野を開発していることである。

新規エステル類の内科および外科分野における別の適用は、プレート、ディスク、シート等のような広範な種類の固体インサートの製造に関するものであるが、これらは既に使用されている金属製または合成プラスチック製のものの代わりに用いられ、インサートの場合ある期間において除去されることを目的とする。蛋白質である動物ポラゲンでできた製剤はしばしば炎症または拒絶の

-173-

この発明による新規エステル類の内科および外科分野における適用の一部は創傷および様々な病変の医療処置に用いる特にスポンジ形態の膨張性物質であることを特徴とする。

次に、この発明による医薬製剤の具体例を記載する。

#### 製剤例1

コルチゾンを含有する漿果

100錠当たりの成分

ヒアルロン酸とコルチゾンの部分エステル(実施例10)、0.200グラム、

p-ヒドロキシ安息香酸エチル、0.010グラム、

p-ヒドロキシ安息香酸メチル、0.050グラム、

塩化ナトリウム、0.900グラム、

注射可能製剤用水、適量加えて100錠とする。

#### 製剤例2

ヒドロコルチゾンを含有する注射溶液

100錠当たりの成分

ヒアルロン酸とヒドロコチジンの部分エステル(実施例11)、0.1グラム、

塩化ナトリウム、0.9グラム、

注射可能製剤用水、適量加えて100mgとする。

#### 製剤例3

ヒアルロン酸とエチルアルコールの部分エステル(実施例3)を含有するクリーム

100mg当たりの成分

ヒアルロン酸とエチルアルコールの部分エステル、0.2グラム、

ポリエチレングリコールモノステアレート40

0、10、000グラム、

セチオール(Cetiol)V、5.000グラム、

ラネット(Lanette)SX、2.000グラム、

パラオキシ安息香酸メチル、0.075グラム、

パラオキシ安息香酸プロピル、0.050グラム、

ジヒドロ酢酸ナトリウム0.100グラム、

グリセリン、U.、1.500グラム、

ソルビトール70、1.500グラム、

-175-

#### 実施例40

ヒアルロン酸エステルを用いた縫糸の製造。

ジメチルスルホキシド中200mg/mlの濃度でHYのベンジルエステル(分子量165000)の溶液を調製する。こうして得られた溶液を0.5mmの穴を有する糸通し器に通してポンプにより圧縮成形する。

スレッドゲージ(threader)をエタノール/ジメチルスルホキシド80:20に浸す(絶えずエタノールを加えることによりこの濃度を一定に保つ)。ジメチルスルホキシドの溶液をこのように浸漬するとほとんどのジメチルスルホキシドが失われていき、縫糸が固化する。

まだジメチルスルホキシドを含んでいる縫糸を伸ばし、次いで繰り返し伸ばし、エタノールで洗浄する。糸を真空気流で乾燥する。

#### 実施例41

ヒアルロン酸エステルでできたスポンジ物質の製造。

カルボキシル基がすべてエステル化された分子

テストクリーム、0.050グラム、

注射可能製剤用水、適量加えて100.00mg

とする。

以下、この発明のヒアルロン酸エステルを用いた物質製造の実施例を記載する。

#### 実施例39

ヒアルロン酸エステルを用いたフィルムの製造。

ジメチルスルホキシド中180mg/mlの濃度でHYのn-プロピルエステル(分子量130000)の溶液を調製した。

ストラチファイヤー(stratifier)により、溶液の薄膜をガラスシート上に展開する。厚さはフィルム最終的な厚さの10倍でなくてはならない。ガラスシートをエタノールに浸してジメチルスルホキシドを吸収させるがHYエステルはエタノールに溶けずに固化する。フィルムをガラスシートからはずし、繰り返しエタノール、次いで水、次いで再びエタノールにより洗浄する。

生成したシートを30°で48時間プレスで乾燥する。

-176-

量170000のヒアルロン酸ベンジルエステル(例えば実施例14記載の方法で得られる)1gを5mlのジメチルスルホキシドに溶解する。調製された溶液各10mlに、300μに相当する粒度の塩化ナトリウム31.5g、置換酸ナトリウム1.28gおよびクエン酸1gからなる混合物を加え、全体をミキサーでホモジナイズする。

ペースト状の混合物を様々な方法、例えば可調距離を置いて互いに向かい合った2個のローラーからなるマングルにより層状にする。この距離を調節しながらペーストをシリコン紙片と一緒にローラー間に通すが、この紙片はこうして形成されたペースト層の支持物の役割を演じることになる。膜を所望の寸法の長さおよび幅に切断し、シリコンからはずし、適度な溶媒例えば水に浸す。こうして得られたスポンジを水のような適当な溶媒で洗浄し、可能なならばガンマ線で殺菌する。

#### 実施例42

ヒアルロン酸エステルでできたスポンジ物質の

製造。

実施例 4 I 記載の方法で他のヒアルロン酸エステルによるスポンジ物質を製造することができる。ジメチルスルホキシドの代わりに所望により、選択されたエステルを溶解し得る他の溶媒を用いることができる。塩化ナトリウムの代わりにヒアルロン酸エステルを溶かすのに使用された溶媒に不溶性の他の固体化合物を用いることもできるが、これは前述の機械的処理後ヒアルロン酸エステルを沈殿させるのに使用された溶媒には可溶性であり、最終的にはスポンジ物質に所望の型の孔をもたらし得る適正な粘度を有する。

重炭酸ナトリウムおよびくえん酸の代わりに、他の 2 種の類似化合物、すなわちヒアルロン酸(エステル)を溶かすのに使用された溶媒のけん濁液または溶液中で互いに反応して、それ程緊密ではないスポンジ物質を生成する効果のある例えば二酸化炭素のような気体を発生するような化合物を用いることができる。このように、重炭酸ナトリウムの代わりに他の重炭酸塩またはアルカリもし

くはアルカリ土類金属の炭酸塩、およびくえん酸の代わりに他の固体形態の酸、例えば亜硝酸を使用することができる。

以上記載した発明について、明らかに多様な変法が存在し得る。このような変法はこの発明の主旨および範囲から逸脱するものとして考えるべきではなく、当技術分野の熟練者に自明の修正はすべて特許請求の範囲内に含まれるものとする。

特許出願人 ファイディーア・ソシエタ・ベル・ア  
チオニ

代理人 弁理士 青山 保 ほか 1 名